

MURILO DALLA COSTA

**Micorrização e resistência a *Fusarium oxysporum* Sch.
f. sp. *herbemontis* em genótipo de porta-enxerto de videira**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor
em Ciências, Área de Concentração em Recursos Genéticos Vegetais

Orientador: Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato, CCA-UFSC
Co-Orientador: Dr. Mario Angelo Vidor, EPAGRI

Florianópolis, fevereiro de 2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

D144m Dalla Costa, Murilo

Micorrização e resistência a *Fusarium oxysporum* Sch. f. sp. herbemontis em genótipo de porta-enxerto de videira [tese] / Murilo Dalla Costa ; orientador, Paulo Emílio Lovato. - Florianópolis, SC, 2010.

159 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Agricultura. 2. Recursos genéticos vegetais. 3. Vitis. 4. Glomus. 5. *Fusarium oxysporum*. 6. Atividade enzimática. 7. Proteômica. I. Lovato, Paulo Emilio. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

CDU 631

**Micorrização e resistência a *Fusarium oxysporum* Sch.
f. sp. *herbemontis* em genótipo de porta-enxerto de videira**

por

Murilo Dalla Costa

Tese julgada e aprovada em 26/02/2010, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Presidente /Orientador)

Dr. Mario Angelo Vidor (Externo/EPAGRI)

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Titular/UFSC)

Prof. Dr. Hernan Francisco Terenzi (Externo/UFSC)

Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho (Externo/UDESC)

Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2010

*Dedico este trabalho aos meus dois amores,
Silvania e à Júlia.
O apoio, o amor e a paciência foram
imprescindíveis para eu chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

À Silvania e à Júlia, esposa e filha dedicadas e companheiras, que participaram de toda essa jornada me dando apoio incondicional. Conseguimos!

A meus pais, Ângelo e Geni, aos meus irmãos Sílvio e Ricardo e à Dona Lúcia e Seu Nivaldo (*in memoriam*) que de longe sempre me ajudaram.

Ao Prof. Lovato, orientador por tantos anos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela oportunidade, apoio e confiança que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

À Epagri, em especial em nome do Dr. Edson Silva, Diretor de Ciência, Tecnologia e Inovação, por ter confiado em meu trabalho e por ter me possibilitado a conclusão do Curso.

Ao Aleksander pela amizade, confiança e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Drs. Hernan Terenzi, Mario Vidor, Miguel Guerra e Osmar Klauberg, e, que aceitaram fazer parte da banca examinadora e contribuíram nesta tese.

À Carol e à Paula, pelo auxílio nas etapas laboratoriais do trabalho e na propagação das videiras necessárias à realização dos experimentos.

À Carolina Tavares, à Gabriela Cangahuala e à Neusa, pelas informações e auxílio que ajudaram na conclusão dos experimentos.

Ao Gilberto, colega de laboratório e de batalha.

Ao Giovane, colega de Extensão Rural, pela amizade e troca de conhecimentos que indiretamente ajudaram nesta tese.

Ao amigo Sandro, pela amizade, ajuda e conversas sobre literatura e música.

À Elisângela e ao “Marcelão”, antes colegas de laboratório e agora colegas de Epagri, pela amizade.

Ao Leandro Crestani, colega de Epagri, pelas saídas a campo e coleta de material vegetal a campo.

Aos amigos e colegas de Laboratório Elisa, Blumenau, Henrique, Rafael, Júlio, Eduardo, Vilmar e Elaine pelo companheirismo.

Aos Profs. Jucinei, Martini e Uberty, pelo convívio e conversas que deram força para chegar ao final.

À Cida e ao Rech pela ajuda no Laboratório de Biotecnologia.

Ao Tássio e a Ângela, colegas de Epagri, pela ajuda logística.

Ao Prof. Marciel Stadnik, pelo repasse de conhecimentos.

Aos amigos de laboratório Chico e Luisinho, que por muitas vezes tornaram a vida mais engraçada.

À Ivanise Rizzatti, da Estação Experimental da Epagri de Caçador-SC, que possibilitou parte das análises.

A CAPES pelo apoio financeiro durante parte da realização do Curso.

Todos que apoiaram no trabalho, por uma palavra de auxílio ou de motivação, mas que ficaram anônimos neste agradecimento.

RESUMO

O declínio e morte de videiras, problema fitossanitário que limita a vitivinicultura no estado de Santa Catarina, tem como um dos agentes causais o fungo do solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. Até o momento, o controle da murcha vascular causada pelo patógeno é feito com uso de porta-enxertos resistentes. A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares na fase de aclimatização de videiras micropropagadas *in vitro* pode acelerar a produção de mudas de alta qualidade; essa biotecnologia pode também reduzir a incidência de *Fusarium* spp., podendo melhorar a expressão do potencial genético de porta-enxertos, até mesmo daqueles suscetíveis ao patógeno. Os mecanismos de resistência de plantas micorrizadas a patógenos radiculares ainda estão pouco esclarecidos, especialmente no que se refere ao papel indutor da simbiose na expressão de genes de defesa da planta. O trabalho tem como objetivo avaliar, em genótipo de porta-enxerto suscetível a fusariose, o papel da formação de micorriza na expressão de proteínas radiculares e na indução de resistência localizada contra *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis*. Mudas micropropagadas de videira da cultivar SO4 foram aclimatizadas e metade delas foram inoculadas com o fungo micorrízico *Glomus intraradices*. Após 75 dias, as raízes das plantas foram mergulhadas em suspensão de conídios de *Fusarium* spp. ou água estéril. Para realizarem-se avaliação dos níveis de atividade hidrolítica das enzimas quitinases e β -1,3-glucanases e para eletroforese bidimensional de proteínas, amostras radiculares foram coletadas aos quatro e aos 14 dias após a inoculação do patógeno, respectivamente. A avaliação de sintomas de infecção por *Fusarium* spp. foi realizada aos 90 dias após inoculação do patógeno. A expressão de quitinases acima dos níveis basais foi induzida nas raízes dos tratamentos com inoculação do fungo micorrízico e/ou patógeno. A atividade de β -1,3-glucanases foi maior somente no tratamento com inoculação de *G. intraradices* e do patógeno. Os simbiontes mutualístico e parasítico induziram 11 e duas proteínas, respectivamente. A formação de micorrizas e a inoculação de *Fusarium* spp. promoveram mudanças no nível de expressão de 13 proteínas do sistema radicular de videiras. Videiras inoculadas com *G. intraradices* apresentaram diminuição nos sintomas de infecção por *Fusarium* spp., sugerindo que a simbiose mutualística promoveu a indução de quitinases e β -1,3-glucanases com ação específica na supressão do patógeno, bem como a expressão diferenciada de proteínas relacionadas com indução de resistência e com efeito bioprotetor contra o patógeno vascular.

Termos para indexação: *Vitis*, *Glomus*, *Fusarium oxysporum*, indução de resistência, atividade enzimática, proteômica.

ABSTRACT

Decline and death of grapevines is a problem that limits the wine and grape production in Santa Catarina State, and the soil fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbementis* is one of its causal agents. Presently, the control of the fusarium wilt is done through the use of resistant rootstocks. Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation during weaning of *in vitro* micropropagated grapevine plantlets could improve the production of high quality plants. This biotechnological procedure could also reduce the incidence of fusarium wilt, allowing grapevines to better express their genetic potential, even in susceptible rootstocks. Resistance mechanisms in mycorrhizal plants against root pathogens are still poorly understood, especially the role of the symbiosis in the induction of plant-defense gene expression. This work aims to evaluate, in genotype of susceptible rootstock to fusarium, the role of mycorrhiza formation in the expression of root protein and in the induction of localized resistance against *F. oxysporum* f. sp. *herbementis*. Half of acclimatized SO4 micropropagated plants were inoculated with the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, and the other half had a substrate with no fungal inoculum. After 75 days, roots were dipped in a suspension of *Fusarium* spp. conidia or in sterile water. To assess activity of hydrolytic enzymes (chitinases and β -1,3-glucanases), and to two-dimensional gel electrophoresis of proteins, root samples were collected four and 14 days after pathogen inoculation, respectively. The evaluation of *Fusarium* spp. infection symptoms was done 90 days after pathogen inoculation. The expression of chitinases above constitutive levels was induced in the roots of treatments with mycorrhizal and/or pathogen inoculation. The activity of β -1,3-glucanases was higher only in the treatment with both mycorrhizal fungus and pathogen inoculation. The mutualistic and parasitic symbionts induced 11 and two proteins, respectively. Mycorrhiza and *Fusarium* spp. inoculation promoted changes in the expression pattern of 13 proteins of the grapevines roots. Mycorrhizal grapevines showed a decrease in internal *Fusarium* spp. infection symptoms. These data suggest that the mutualistic symbiosis promoted induction of chitinases and β -1,3-glucanases with specific action on pathogen suppression, as well as differentiated expression of proteins related to resistance induction and with a bioprotector effect against the vascular pathogen.

Index terms: *Vitis*, *Glomus*, *Fusarium oxysporum*, resistance induction, enzymatic activity, proteomic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas típicas de *Fusarium oxysporum* sob microcultivo em SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar). 1a: macroconídios (mac) sobre microfíalides curtas (mf). 1b: microconídios (mic) e macroconídios (mac). 1c: clamidósporo (cla) formado a partir de macroconídio. 1d: clamidósporos (cla) formados a partir de hifas. Fonte: fotografias do autor.24
- Figura 2.** Reconhecimento de *Fusarium oxysporum*, sinalização intracelular, rotas de transdução de sinais e produtos gênicos envolvidos nas respostas de resistência de *Arabidopsis thaliana* ao patógeno, de acordo com o entendimento atual. MAP3K: MAP-quinase quinase quinase; MAP2K: MAP-quinase quinase; MAPK: MAP-quinase. FT: fator de transcrição. PR: proteína relacionada a patogênese. PR-1: função desconhecida; PR-5: similar a taumatina; PR-4: do tipo quitinase; TT5: transparent testa 5, do tipo chalcona isomerase; PDF1.2: proteína antifúngica de baixa massa molecular rica em cisteína; THI2.1: proteína do tipo tionina, capaz de se ligar a receptor de toxina. Adaptado de Berrocal-Lobo & Molina (2008), com informações adicionais de iHOP (2010) e Kersten & Nagel (2010).30
- Figura 3.** Estruturas típicas de fungo micorrízico arbuscular. 1a e 1b: arbúsculos (ar), hifas intrarradiculares (hi) e vesículas (ve) de *Glomus intraradices* em associação com tecidos radiculares de videira. 1c: detalhe de vesícula de *Glomus intraradices*. 1d: detalhe de arbúsculos em células do córtex radicular. Fonte: fotografias do autor.34
- Figura 4.** Arbúsculo de *Glomus intraradices* em associação com tecidos radiculares de videira e representação esquemática de estruturas envolvidas na interface da simbiose entre células radiculares e fungos micorrízicos arbusculares. MPV: membrana plasmática vegetal; PCV: parede celular vegetal; CF: citoplasma do fungo micorrízico; MPF: membrana plasmática do fungo micorrízico; MPA: membrana periarbuscular; EPA: espaço periarbuscular. Adaptado de Parniske (2008). Fonte: fotografia do autor.36
- Figura 5.** Dogma central da biologia e áreas de estudos correlatas aos níveis do fluxo de informação genética (adaptado de RÉDEI, 2008).54
- Figura 6.** Representação esquemática dos procedimentos de condução do Experimento 1. As etapas foram conduzidas simultaneamente para os porta-enxertos de videira SO4 e R110, que são suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbementis*, respectivamente.68
- Figura 7.** Teores de proteínas totais (mg g raiz fresca⁻¹) de amostras radiculares dos porta-enxertos de videira SO4 e R110, suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbementis*, respectivamente, entre zero e cinco dias após inoculação do patógeno (+Fo) ou imersão de raízes em água estéril (-Fo) (daí: dias após inoculação do patógeno).70

Figura 8. Atividade de quitinases (unidades de absorbância a λ 550 nm g raiz fresca⁻¹ h⁻¹) de amostras radiculares dos porta-enxertos de videira SO4 e R110, suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, respectivamente, entre zero e cinco dias após inoculação do patógeno (+Fo) ou imersão de raízes em água estéril (-Fo) (dai: dias após inoculação do patógeno).... 71

Figura 9. Atividade de β -1,3-glucanases (unidades de absorbância a λ 600 nm g raiz fresca⁻¹ h⁻¹) de amostras radiculares dos porta-enxertos de videira SO4 e R110, suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, respectivamente, entre zero e cinco dias após inoculação do patógeno (+Fo) ou imersão de raízes em água estéril (-Fo) (dai: dias após inoculação do patógeno).... 71

Figura 10. Atividade de quitinases (unidades de absorbância a λ 550 nm mg proteína⁻¹ h⁻¹) de amostras radiculares dos porta-enxertos de videira SO4 e R110, suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, respectivamente, entre zero e cinco dias após inoculação do patógeno (+Fo) ou imersão de raízes em água estéril (-Fo) (dai: dias após inoculação do patógeno).... 72

Figura 11. Atividade de β -1,3-glucanases (unidades de absorbância a λ 600 nm mg proteína⁻¹ h⁻¹) de amostras radiculares dos porta-enxertos de videira SO4 e R110, suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, respectivamente, entre zero e cinco dias após inoculação do patógeno (+Fo) ou imersão de raízes em água estéril (-Fo) (dai: dias após inoculação do patógeno).... 72

Figura 12. Representação esquemática dos procedimentos de condução do Experimento 2. +Gi: videiras inoculadas com *Glomus intraradices*; -Gi: controle desse tratamento, formado por plantas que não receberam inoculante micorrízico e tiveram a microbiota não-micorrízica reconstituída; +Fo: videiras que tiveram o sistema radicular inoculado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*; -Fo: controle desse tratamento, no qual o sistema radicular das plantas foram imersos em água estéril. 79

Figura 13. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 não micorrizadas (-Gi) ou micorrizadas com *Glomus intraradices* (+Gi) após 45 dias do final da aclimatização *ex vitro*. Fonte: fotografias do autor. 85

Figura 14. Biomassa fresca (g), relação entre biomassas fresca do sistema radicular e da parte aérea (SR/PA) e taxa de colonização do córtex radicular (M%) de mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 após 45 dias da inoculação (+Gi) ou não (-Gi) de *Glomus intraradices* na fase de aclimatização *ex vitro*. Para biomassa fresca, colunas inferiores e superiores representam biomassas do sistema radicular e da parte aérea, respectivamente. Barras indicam erro-padrão; asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$; n = 8). 86

Figura 15. Colonização micorrízica por *Glomus intraradices* em tecidos radiculares do porta-enxerto de videira SO4. 1a e 1b: arbúsculos (ar), hifas intrarradiculares (hi) e vesículas (ve) de *Glomus intraradices*. 1c: raiz de videira não micorrizada. 1d: detalhe de região do córtex radicular com alta concentração de arbúsculos de *Glomus intraradices*. Fonte: fotografias do autor. 86

Figura 16. Atividade enzimática de quitinases e β -1,3-glucanases (unidades de absorbância $\text{mg proteínas}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e teores de proteínas totais ($\text{mg g raiz fresca}^{-1}$) de amostras radiculares de mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Fo). Avaliação foi realizada quatro dias após a inoculação do patógeno. Unidades de absorbância (UA) da atividade hidrolítica de quitinases e β -1,3-glucanases estimadas a 550 nm e 600 nm, respectivamente. Barras indicam erro-padrão; asterisco indica tratamento com diferença significativa em relação aos demais (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$; $n = 10$).88

Figura 17. Perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 inoculadas com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Fo) e amostradas no momento (0 dai) e aos 14 dias após a inoculação do patógeno (14 dai). Números indicam proteínas apresentadas nas Figuras 18, 19 e 20.91

Figura 18. Bandas de proteínas com diminuição e aumento no nível de expressão (NIs 009 e 149, respectivamente) em amostras radiculares de videiras micorrizadas. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Fo) e amostradas aos 14 dias após a inoculação do patógeno.97

Figura 19. Bandas de proteínas induzidas (NI 396) e reprimidas (NI 474) em amostras radiculares de videiras micorrizadas. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Fo) e amostradas aos 14 dias após a inoculação do patógeno.98

Figura 20. Banda de proteína com aumento no nível de expressão em amostras radiculares de videiras micorrizadas e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (NI 186) e banda de proteína induzida pelo patógeno em amostras radiculares de videiras micorrizadas (NI 496). Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium* spp. (Fo) e amostradas aos 14 dias após a inoculação do patógeno.99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis analisadas no Experimento 2 e respectivos períodos de amostragem após a inoculação do patógeno. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com <i>Glomus intraradices</i> e/ou <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbomontis</i> e amostradas no momento da inoculação (0 dai), 4, 14, 14 e 90 dias após a inoculação do patógeno (dai).....	78
Tabela 2. Concentração de macro (g kg^{-1}) e micronutrientes (mg kg^{-1}) em tecidos da parte aérea e do sistema radicular e eficiência micorrízica (+Gi/-Gi) de mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 micorrizadas (+Gi) ou não micorrizadas (-Gi) com <i>Glomus intraradices</i> após 45 dias do término da fase de aclimatização <i>ex vitro</i>	87
Tabela 3. Teores de proteínas totais obtidos a partir de extração fenólica de amostras radiculares de mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 submetidas à inoculação com <i>Glomus intraradices</i> (Gi) e/ou <i>F. oxysporum</i> (Fo). Avaliações foram realizadas no momento da inoculação (0 dai) e aos 14 dias (14 dai) após a inoculação do patógeno.....	89
Tabela 4. Número de identificação (NI), ponto isoeletrico (pI), massa molecular (MM) e volume relativo (%) de bandas de proteínas do sistema radicular de videiras reguladas pela infecção por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbomontis</i> . Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com <i>Glomus intraradices</i> (Gi) e/ou <i>Fusarium</i> spp. (Fo) e amostradas no momento da inoculação (0 dai) e aos 14 dias (14 dai) após a inoculação do patógeno.	90
Tabela 5. Número de identificação (NI), ponto isoeletrico (pI), massa molecular (MM) e volume relativo (%) de bandas de proteínas do sistema radicular de videiras reguladas pela formação de micorrizas. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com <i>Glomus intraradices</i> (Gi) e/ou <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbomontis</i> (Fo) e amostradas no momento da inoculação (0 dai) e aos 14 dias (14 dai) após a inoculação do patógeno.	93
Tabela 6. Número de identificação (NI), ponto isoeletrico (pI), massa molecular (MM) e volume relativo (%) de bandas de proteínas do sistema radicular de videiras reguladas pela formação de micorrizas e infecção por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbomontis</i> . Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com <i>Glomus intraradices</i> (Gi) e/ou <i>Fusarium</i> spp. (Fo) e amostradas no momento da inoculação (0 dai) e aos 14 dias (14 dai) após a inoculação do patógeno.....	95
Tabela 7. Índice de doença de sintomas internos e externos, biomassa seca (g), taxa de colonização do córtex radicular (M%) e concentração de arbúsculos na fração radicular micorrizada (a%) de mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 submetidas à inoculação com <i>Glomus intraradices</i> (Gi) e/ou <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbomontis</i> (Fo). Avaliação foi realizada 90 dias após a inoculação do patógeno.	100

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Número de identificação (NI), ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MM) e volume relativo (%) de bandas de proteínas do sistema radicular de videiras sem alteração no nível de expressão acima de fator igual a dois de acordo com os tratamentos testados. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com <i>Glomus intraradices</i> (Gi) e/ou <i>Fusarium</i> spp. (Fo) e amostradas no momento da inoculação (0 dai) e aos 14 dias (14 dai) após a inoculação do patógeno.	135
Anexo B. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 não inoculadas com <i>Glomus intraradices</i> (-Gi) e amostradas no momento da inoculação de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbementis</i> (0 dai).	144
Anexo C. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 micorrizadas com <i>Glomus intraradices</i> (-Gi) e amostradas no momento da inoculação de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbementis</i> (0 dai).	147
Anexo D. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 não inoculadas com <i>Glomus intraradices</i> (-Gi) e com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbementis</i> (-Fo). Amostras foram coletadas 14 dias após imersão do sistema radicular em água estéril (14 dai).	150
Anexo E. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 não micorrizadas com <i>Glomus intraradices</i> (-Gi) e inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbementis</i> (+Fo). Amostras foram coletadas 14 dias após imersão do sistema radicular em suspensão de conídios do patógeno (14 dai).	153
Anexo F. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 micorrizadas com <i>Glomus intraradices</i> (+Gi) e não inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbementis</i> (-Fo). Amostras foram coletadas 14 dias após imersão do sistema radicular em água estéril (14 dai).	156
Anexo G. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 micorrizadas com <i>Glomus intraradices</i> (+Gi) e inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbementis</i> (+Fo). Amostras foram coletadas 14 dias após imersão do sistema radicular em suspensão de conídios do patógeno (14 dai).	159

LISTA DE ABREVIATURAS

a%: concentração de arbúsculos na fração radicular micorrizada
ATP: adenosina trifosfato
Avr: avirulência
BDA: batata-dextrose-ágar
C. V.: coeficiente de variação
CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate
dai: dias após inoculação do patógeno
DIECA: *diethyldithiocarbamic acid*
DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)
DTT: 1,4-dithio-DL-threitol
EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)
FMA: fungos micorrízicos arbusculares
IPG: *Strips of immobilized pH gradients* (tiras de gradients de pH imobilizado)
ISR: *Induced Systemic Resistance* (Resistência Sistêmica Induzida)
kDa: kilodalton
M%: taxa de colonização micorrízica
mA: miliampere
MM: massa molecular
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NI: Número de identificação
pI: ponto isoelétrico
PMSF: *Phenylmethanesulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetanosulfonyl)
PVLG: álcool polivinílico – ácido láctico - glicerol
PVPP: polivinilpolipirrolidona
PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)
SAR: *Systemic Acquired Resistance* (Resistência Sistêmica Adquirida)
SDS: *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
SR/PA: razão entre biomassas do sistema radicular e da parte aérea
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina
Tris: Tris-[hidroximetil] aminometano

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
INTRODUÇÃO	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1. Vitivinicultura no estado de Santa Catarina	18
2. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbemontis</i>	20
3. <i>Fusarium oxysporum</i>	22
3.1. Como <i>Fusarium oxysporum</i> ataca as plantas	25
3.2. Como as plantas se defendem de <i>Fusarium oxysporum</i>	27
4. Micorrizas arbusculares	33
4.1. Aspectos gerais	33
4.2. Micorrizas e o status nutricional do hospedeiro vegetal	37
4.3. Micorrizas e a expressão de genes de defesa da planta	38
4.4. O efeito supressivo de micorrizas a patógenos do solo	43
4.4.1. <i>Competição direta entre FMA e patógenos</i>	45
4.4.2. <i>Regulação da população microbiana no solo</i>	46
4.4.3. <i>Modificações no crescimento, nutrição e morfologia vegetal</i>	46
4.4.4. <i>Respostas de defesa a patógenos em plantas micorrizadas</i> ...	47
4.4.5. <i>Sinais e eventos regulados por micorrizas em respostas de defesa a patógenos</i>	50
5. Proteômica	53
5.1. O advento da proteômica	53
5.2. Um paralelo entre proteômica e genômica	55
5.3. Eletroforese e espectrometria de massa	56
5.4. Proteômica em estudos com plantas	57
5.5. Proteômica em interações entre plantas-microorganismos	58
6. Síntese	62
OBJETIVOS E HIPÓTESE	64

EXPERIMENTO 1. Monitoramento da atividade de quitinases e β -1,3-glucanases em raízes de videiras inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*65

1. Material e Métodos	65
1.1. Recursos biológicos.....	65
1.1.1. Porta-enxertos de videira	65
1.1.2. Inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbemontis</i>	66
1.2. Atividade de quitinases e β -1,3-glucanases	67
2. Resultados	70
3. Discussão	73

EXPERIMENTO 2: Perfis de expressão de proteínas radiculares e indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* em genótipo de porta-enxerto de videira micorrizado com *Glomus intraradices*76

1. Material e Métodos	76
1.1. Recursos biológicos.....	76
1.1.1. Porta-enxerto de videira	76
1.1.2. Inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbemontis</i>	77
1.2. Procedimentos experimentais	77
1.3. Amostragens e análises de material vegetal.....	80
1.3.1. Biomassa e concentração de nutrientes de tecidos vegetais ..	80
1.3.2. Colonização micorrízica	80
1.3.3. Atividade de quitinases e β -1,3-glucanases	80
1.3.4. Extração fenólica, eletroforese bidimensional de proteínas e perfis protéicos.....	81
1.3.5. Sintomas externos e internos de ataque por <i>Fusarium</i> spp....	84
2. Resultados	85
2.1. Biomassa do sistema radicular e da parte aérea e colonização micorrízica.....	85
2.2. Atividade de quitinases e β -1,3-glucanases	88
2.3. Extração fenólica, eletroforese bidimensional e perfis protéicos	89
2.4. Sintomas externos e internos de ataque por <i>Fusarium</i> spp.	100
3. Discussão	101

CONCLUSÕES.....110

PERSPECTIVAS FUTURAS111

REFERÊNCIAS113

ANEXOS135

INTRODUÇÃO

O cultivo da videira tem importante papel econômico e social na região Sul do Brasil. Em Santa Catarina, a produção de uvas e vinhos está entre as principais atividades de agricultores familiares dos municípios da região do Vale do Rio do Peixe e região Carbonífera (EPA-GRI/CEPA, 2008). Em virtude de um cenário favorável e do desenvolvimento de sistemas de produção de uvas finas para a produção de vinho, está ocorrendo a expansão de áreas de vitivinicultura na região Serrana, a qual pode proporcionar um aumento significativo na geração de renda a agricultores catarinenses.

Embora as tendências sejam positivas a esse setor da fruticultura catarinense, muitos produtores têm abandonado a produção de uva e vinho por causa de problemas que inviabilizam o cultivo da videira. Em relação à fitossanidade, um dos entraves mais graves é o declínio e morte de videiras, que tem como um dos agentes causais o fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. Esse patógeno, que infecta as plantas através do sistema radicular, encontra-se disseminado nos solos dos vinhedos do Sul do Brasil (GARRIDO et al., 2004a). Até o momento, a forma de controle mais preconizada para o controle da fusariose é o uso de porta-enxertos resistentes (EPAGRI, 1998; SCHUCK et al., 2007). A busca de novos genótipos é uma necessidade constante, uma vez que o uso de poucos cultivares pode exercer uma pressão de seleção nas populações do patógeno. O uso integrado da resistência varietal e do controle biológico é uma estratégia promissora na diminuição da incidência e dos prejuízos dessa doença.

A micropropagação e a micorrização são biotecnologias que oferecem perspectivas de melhora qualitativa na produção de mudas de videira. Mediante técnicas de cultura de células e de tecidos vegetais, é possível a manutenção de características desejáveis dos recursos genéticos de uma determinada cultura e, no caso de videira, a produção em escala de mudas de variedades de porta-enxertos resistentes a fusariose. Dessa forma, pode-se disponibilizar, a partir de material vegetativo isento de patógenos, porta-enxertos adequados para a formação de vinhedos de forma mais rápida e segura que os métodos tradicionais de propagação por estaquia e enxertia.

As micorrizas, de ocorrência generalizada na natureza, são associações entre determinados fungos do solo e as raízes das plantas; um dos efeitos mais pronunciado dessa simbiose é o aumento na absorção de nutrientes e água pelas hifas do fungo, que são disponibilizados ao

hospedeiro em troca de fotossintatos (SMITH & READ, 2008). A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na fase de aclimação de videiras micropropagadas, além de acelerar o processo de produção de mudas de alta qualidade, também pode diminuir a incidência da fusariose. Estudos de interações entre patógenos e hospedeiros vegetais mostraram que a micorrização das plantas pode reduzir a severidade de ataque de fungos causadores de doenças radiculares, demonstrando o potencial de uso dessa biotecnologia como controle biológico (DAR et al., 1997; CHU et al., 1997; POZO et al., 2002a; ZHU & YAO, 2004; BORGES et al., 2007). A supressão da fusariose em videiras micorrizadas poderá melhorar a expressão do potencial genético de porta-enxertos, até mesmo daqueles mais suscetíveis à infecção pelo patógeno.

Embora o controle de doenças radiculares pela formação de micorrizas já tenha sido objeto de diversos trabalhos, os processos envolvidos na resistência ainda estão pouco esclarecidos, especialmente no que se refere ao papel indutor de micorrizas na expressão de genes de defesa da planta e de supressão de patógenos (VIERHEILIG et al., 2008). Dessa forma, a interação *Fusarium* spp. x *Vitis* spp. apresenta-se como um patossistema de interesse para a compreensão de processos fisiológicos relacionados à indução de resistência por micorrizas contra patógeno radicular.

A partir destes pressupostos, o trabalho tem como objetivo avaliar, em genótipo de porta-enxerto suscetível a fusariose, o papel da formação de micorriza na expressão de proteínas radiculares e na indução de resistência localizada contra *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Vitivinicultura no estado de Santa Catarina

A produção de uvas no Brasil é gira em torno de 1,3 milhões de tonelada ao ano, volume do qual aproximadamente metade vai para processamento, na produção de sucos, vinhos e outros derivados, e a outra metade para consumo *in natura* (MELLO, 2009; IBGE, 2010). Segundo dados do IBGE de 2008 (IBGE, 2010) A área de produção de uva é pouco mais de 81.000 hectares, dos quais mais de 70% se encontra na região Sul do país. O estado de Santa Catarina é o sexto produtor nacional de uva e o segundo produtor nacional de vinhos e mosto, com 4% e 5% do volume total, respectivamente (ICEPA/SC, 2004; EPAGRI/CEPA, 2008).

A vitivinicultura catarinense está concentrada principalmente nos municípios da Microrregião de Joaçaba, que respondem por mais de 60% da produção estadual e possuem as principais cantinas de vinho (EPAGRI/CEPA, 2008). Nessa região, onde 85% dos estabelecimentos rurais têm até 50 hectares (IBGE, 1997), o cultivo da videira e a produção de vinho são realizados principalmente por agricultores familiares, gerando uma quantidade expressiva de empregos e adquirindo assim um papel importante do ponto de vista socioeconômico (GALLOTTI, 1991; EPAGRI/CEPA, 2008).

As áreas de vinhedo em Santa Catarina apresentaram um aumento nos últimos anos (SANTA CATARINA, 2003), girando em torno de 4.800 hectares (IBGE, 2010). Iniciativas do poder público estadual e do setor privado apontam para uma expansão do quadro atual desse setor da fruticultura, principalmente nas regiões Oeste e Serrana de Santa Catarina. Essa última região conta com mais de 200 ha de uvas viníferas para produção de vinho, embora os primeiros vinhedos tenham sido implantados há menos de 10 anos (EPAGRI/CEPA, 2008). Para se garantir espaço e competitividade, principalmente no mercado externo, torna-se necessária a busca de novas tecnologias que visem à obtenção de um produto com menor custo de produção e de alta qualidade, alcançados pelo menor uso de produtos químicos no cultivo desta frutífera.

Questões relacionadas ao mercado de uva e vinho se apresentam como fatores de risco e desestímulo aos vitivinicultores de Santa Catarina: a competição da produção catarinense com a de outros estados brasileiros, especialmente o Rio Grande do Sul, e a importação de vinhos finos da Argentina e Chile, favorecida pelo câmbio favorável (EPA-

GRI/CEPA, 2008). A especulação por parte de compradores e o baixo preço pago à uva *in natura* também são problemas enfrentados na viticultura catarinense (BARNI et al., 2007).

Em relação à fitossanidade, as doenças causadas por fungos constituem entraves a expansão da vitivinicultura em nosso estado. Os gastos com o controle de doenças podem representar até um terço do custo de produção, sem contar riscos de contaminação do agricultor e do meio ambiente com produtos tóxicos comumente utilizados (SÔNEGO et al., 2005). Na parte aérea, as principais doenças são o míldio (*Plasmopara viticola*), a antracnose (*Elsinoe ampelina*), a podridão cinzenta (*Botryotinia fuckeliana*), o oídio (*Uncinula necator*), além de podridões do cacho causadas por *Melanconium fuligineum* e *Glomerella cingulata* (SÔNEGO et al., 2005).

Em relação ao sistema radicular, o declínio e morte de videiras é um problema fitossanitário que assola os vinhedos de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (GARRIDO et al., 2004a). Os censos agropecuários de 1985 e 1995 mostraram que em Santa Catarina, durante esse período, houve diminuição na área colhida de uva de 5.604 hectares para 2.899 hectares, acompanhado de redução na produtividade (ICEPA/SC, 1998). O desestímulo de viticultores na manutenção dessa atividade foi atribuído, entre outros fatores, ao declínio e morte de videiras (GALLOTTI & SCHUCK, 1991; EPAGRI, 1998). Em Santa Catarina, na região do Vale do Rio do Peixe, esse problema foi motivo para o arranquio de 50% das videiras entre os anos de 1980 e 1990 (TAGLIARI, 2006).

Os principais agentes bióticos relacionados ao declínio e morte de videiras são (GARRIDO & SÔNEGO, 1999; GARRIDO et al., 2004a):

- vírus causadores do complexo rugoso da videira;
- insetos: pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis*), filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), cochonilhas-do-tronco (*Hemiberlesia lataniae*, *Duplaspidiotus tesseratus* e *D. fossor*);
- fungos: causadores de murcha vascular (*Fusarium oxysporum*), de podridão radicular (*Cylindrocarpon* sp., *Verticillium* sp., *Rosellinia necatrix*, *Armillaria mellea* e *Phytophthora* sp.), de apodrecimento do tronco e ramos (*Botryosphaeria* sp., *Eutypa lata*, *Phomopsis viticola* e *Stereum* sp.).

Pode-se constatar em uma planta, por exemplo, a presença de três agentes etiológicos do declínio e morte de videiras. As viroses, insetos e fungos causam debilitação gradual e diminuem o desenvolvimento e produção dos vinhedos (GARRIDO et al., 2004a).

2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*

Fusarium oxysporum Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen f. sp. *herbemontis* Tochetto é agente causador da doença conhecida como fusariose e é um dos principais causadores de declínio e morte de videiras. O nome da *forma specialis* é originado da cultivar de videira Herbemont, na qual foi feito o trabalho pioneiro de investigação, identificação e isolamento de *F. oxysporum* por Tochetto (1954). Esse fungo está disseminado nos solos do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (GRIGOLETTI JR., 1993; GARRIDO et al., 2004a).

O micélio de *Fusarium* spp. infecta as videiras através das raízes, penetrando no sistema vascular das plantas e, dessa forma, provocando o bloqueio dos vasos do xilema e a morte por efeitos indiretos, devido à obstrução de transporte de água (GALLOTTI & GRIGOLETTI JR., 1990). A invasão dos tecidos radiculares é facilitada por ferimentos causados por implementos agrícolas ou por pragas do solo (SÔNEGO et al., 2005). Propriedades comuns nos solos das regiões de cultivo de videira, como acidez e teor alto de matéria orgânica são favoráveis à doença. Mudas de viveiros contaminados podem representar uma forma de disseminação a longas distâncias (SÔNEGO et al., 2005).

As plantas apresentam retardamento nas brotações e diminuição no vigor, com folhas pequenas e necróticas. No verão pode ocorrer uma forma aguda da doença; em plantas aparentemente normais, as folhas murcham e ficam amareladas e os cachos murcham e ficam aderidos ao ramo. O sintoma interno, visível a olho nu e característico da doença é o escurecimento da região do lenho ou xilema, que pode se prolongar da raiz até a parte aérea (GALLOTTI, 1989; GALLOTTI & GRIGOLETTI JR., 1990; GRIGOLETTI JR., 1993; GARRIDO & SÔNEGO, 1999; SÔNEGO et al., 2005). Ao microscópio, são observadas a formação de tiloses e a produção de gomas, reações da planta frente ao avanço do patógeno, mas que contribuem para a obstrução dos vasos de xilema (GRIGOLETTI JR., 1993).

O declínio e morte de videiras causado por *F. oxysporum* não é exclusividade do Brasil. Em vinhedos da Califórnia, *F. oxysporum* está associado a podridões radiculares (OMER et al., 1999), não sendo agente causal de murcha vascular como é o caso no Brasil. Embora não tenha se mostrado claramente, esses autores relacionaram a incidência do fungo com a população de filoxera no solo, uma vez que esse inseto pode causar ferimentos nas raízes que servem de ponto de infecção para o fungo (OMER et al., 1999). Tal associação inseto-praga/fungo patogênico provavelmente ocorre, nas condições do Sul do Brasil, entre a

pérola-da-terra e *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis*, sugerindo a necessidade de estudos.

Fusarium sp. e *Fusarium oxysporum* foram isolados de mudas de videira em viveiros apresentando sintomas de declínio na África do Sul (HALLEEN et al., 2003) e na Polônia (KRÓL, 2006), respectivamente. Na Austrália, *F. oxysporum* causou podridão radicular e diminuição do volume de raízes que resultaram em brotações fracas e atrasadas e baixa produtividade de frutos (HIGHET & NAIR, 1995).

Os estudos acima demonstraram que, diversamente das condições do Brasil, a espécie *F. oxysporum* é agente causador de podridões radiculares e não de murcha vascular. No mesmo sentido, a ocorrência da forma *specialis herbemontis* de *F. oxysporum* em videira foi registrada, até o momento, somente em áreas brasileiras, principalmente nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (GALLOTTI, 1991; GARRIDO et al., 2004a), não se encontrando, a partir de busca realizada em um banco internacional de referências bibliográficas (<http://apps.isiknowledge.com>), artigos ou informações sobre o assunto em outros países.

De forma semelhante ao que ocorre com outros patógenos radiculares, *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis* é de difícil controle. O fungo sobrevive no solo na forma de clamidósporos, que são estruturas de resistência, ou em tecidos anteriormente infectados, como raízes (GRIGOLETTI JR., 1993), tornando a área atacada praticamente inviável para novos cultivos, forçando seu abandono e a mudança dos vinhedos para outros locais (GALLOTTI & GRIGOLETTI JR., 1990). O uso de produtos químicos em videiras atacadas pelo patógeno mostrou pouca eficiência, além de tais substâncias acarretarem aumento no custo de produção e serem perigosos ao ambiente e à saúde do produtor e do consumidor (SCHUCK et al., 1993).

Dessa forma, o uso de porta-enxertos resistentes à fusariose é uma das mais eficientes medidas de controle dessa doença. A resistência varietal é, inclusive, critério preponderante na seleção de genótipos de porta-enxertos de videira para Santa Catarina. Embora possuam capacidade de enraizamento baixa, os porta-enxertos Paulsen 1103, R99 (*Vitis berlandieri* x *V. rupestris*), VR043-43 e VR039-19 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) são recomendados atualmente em Santa Catarina, em virtude da resistência a *Fusarium* spp. (EPAGRI, 1998; SCHUCK et al., 2007). Entretanto, mesmo sendo os menos suscetíveis, porta-enxertos como Paulsen 1103 morrem em decorrência do ataque do patógeno; sua vantagem de uso é o de terem um ciclo de vida produtivo relativamente mais longo que as demais cultivares (GALLOTTI & SCHUCK, 1991).

Os porta-enxertos do grupo *V. berlandieri* x *V. riparia* (SO4, Kober 5BB, Solferino), que já foram bastante utilizados nas regiões produtoras de uva em Santa Catarina por suas características desejáveis, são altamente suscetíveis ao ataque de *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis* (SCHUCK et al., 1993; ANDRADE et al., 1993; GRIGOLETTI JR., 1993). Porta-enxertos de *V. riparia* x *V. rupestris* (101-14, 3306, 3309) têm resistência intermediária, enquanto os pertencentes ao cruzamento *V. berlandieri* x *V. rupestris*, são resistentes, como mostrado acima. Isso indica que a espécie *V. riparia* é a fonte de suscetibilidade (GRIGOLETTI JR., 1993). No trabalho de Omer et al. (1999), o porta-enxerto R110 apresentou resistência mediana e os porta-enxertos St. George (*V. rupestris*), 420A e 5C (*V. berlandieri* x *V. riparia*) não apresentaram sintomas de podridão radiculares nas condições do estudo.

Grigoletti Jr. (1985) não constatou interações diferenciadas entre genótipos de videira e isolados de *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis*, indicando a inexistência de raças fisiológicas de patógeno.

3. *Fusarium oxysporum*

O gênero *Fusarium* é formado por fungos de distribuição cosmopolita, e inclui espécies causadoras de doenças tanto em plantas como animais, tendo, inclusive, prováveis usos na elaboração de armas biológicas (LESLIE & SUMMEREL, 2006). A principal característica do gênero é a produção de macroconídios fusiformes como uma das estruturas de reprodução assexuada (BOOTH, 1975; DI PIETRO et al., 2003). Esses fungos do solo são necrotróficos, ou seja, matam tecidos vegetais com toxinas ou enzimas que promovem a lise e morte da célula hospedeira, permitindo o acesso a nutrientes e o crescimento do patógeno (AGRIOS, 2005; OKUBARA & PAULITZ, 2005).

Algumas espécies de *Fusarium* completam o ciclo sexual, possuindo o estado teleomórfico, e tecnicamente passam a ter outra denominação de gênero. Por exemplo, *Gibberella zeae* é o estado teleomórfico correspondente a *F. graminearum*. De acordo com Leslie & Summerel (2006), os gêneros *Albonectria*, *Gibberella* e *Haematonectria* compreendem os teleomorfos conhecidos de espécies de *Fusarium*. Para a maioria das espécies ainda se conhece somente o estado anamórfico, onde há somente a produção de esporos assexuados (DI PIETRO et al., 2003; LESLIE & SUMMEREL, 2006).

A presença de *Fusarium* nos solos agrícolas e em formações vegetais é generalizada; Leslie & Summerel (2006) destacam que “se está verde, há algum *Fusarium* que pode crescer sobre, dentro ou com ele”.

Da mesma forma que possuem um amplo espectro de hospedeiros vegetais, as espécies patogênicas de *Fusarium* causam vários tipos de doenças: podridões de raízes e de frutos, cancos, doenças foliares e murchas vasculares. São exemplos: *Fusarium solani*, causador de podridões radiculares e de sementes; *F. decemcellulare*, causador de cancos em frutíferas tropicais; *F. redolens*, agente causal de podridões radiculares em plantas de regiões temperadas; *F. proliferatum*, causador de podridões em frutos; *F. subglutinans*, causador de manchas foliares; e *F. oxysporum*, agente causal de murchas vasculares (LESLIE & SUMMEREL, 2006).

Dentro do gênero *Fusarium*, *F. oxysporum* é, sem dúvida, a de maior destaque, sendo a espécie mais dispersa no planeta, podendo ser encontrada até no ártico. *F. oxysporum* é um fungo do solo e compreende mais de 120 formae speciales, subdivisão taxonômica utilizada para as variantes patogênicas, de acordo com a espécie hospedeira infectada (DI PIETRO et al., 2003; LESLIE & SUMMEREL, 2006). São exemplos de hospedeiro e patógeno respectivo: tomateiro e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; bananeira e *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. O ataque de *F. oxysporum* está associado a murchas vasculares, embora possa causar também podridões radiculares em lírio (BAAYEN & RIJKENBERG, 1999) e em videira (OMER et al., 1999).

Não há distinção morfológica clara de isolados de *F. oxysporum* pertencentes a diferentes formae speciales. Para algumas destas categorias taxonômicas existe a divisão em raças fisiológicas, caracterizadas de acordo com a interação diferenciada entre uma ou mais estirpe do patógeno e genótipos do hospedeiro vegetal (GORDON & MARTYN, 1997; AGRIOS, 2005).

Os principais critérios morfológicos que distinguem *F. oxysporum* das demais espécies do gênero são: a formação de monofiáides curtas, das quais são produzidos microconídios em falsas cabeças; a produção de clamidósporos (esporo de resistência); e a morfologia dos macro e microconídios (Figura 1) (GORDON & MARTYN, 1997; LESLIE & SUMMEREL, 2006).

É conhecido somente o estado anamórfico de *F. oxysporum*. Embora se reproduza assexuadamente, a espécie possui uma variabilidade genética considerável, observada pelas variações de formae speciales e de isolados não patogênicos habitantes do solo, por exemplo. Essa capacidade de alcançar combinações genéticas está relacionada a estratégias como mutações mediadas por transposons ou “genes saltitantes”; perdas parciais ou completas de cromossomos; e à parassexualidade, na qual há recombinação, pela troca de cromossomos ou de fragmentos destes,

através de células das hifas que possuem dois núcleos geneticamente diferentes (GORDON & MARTYN, 1997; TEUNISSEN et al., 2002; AGRIOS, 2005). Na manutenção de isolados patogênicos do fungo *in vitro*, a manipulação e a multiplicação em meios nutritivos podem induzir a mutações rapidamente, promovendo o desenvolvimento de isolados não patogênicos. Na produção de inóculo de *F. oxysporum*, uma estratégia para impedir isso é permitir o crescimento de colônias do fungo com diâmetros relativamente pequenos, diminuindo assim a taxa de mutações por parassexualidade (NELSON et al., 1983).

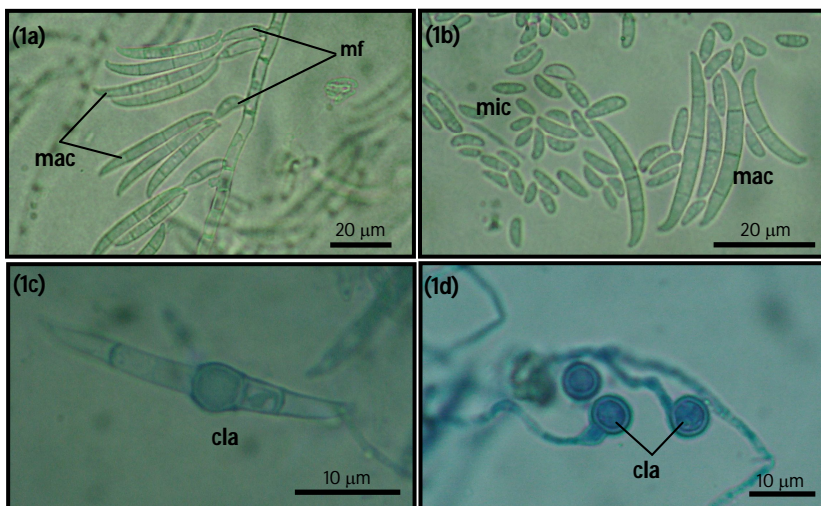


Figura 1. Estruturas típicas de *Fusarium oxysporum* sob microcultivo em SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar). 1a: macroconídios (mac) sobre microfiálides curtas (mf). 1b: microconídios (mic) e macroconídios (mac). 1c: clamidósporo (cla) formado a partir de macroconídio. 1d: clamidósporos (cla) formados a partir de hifas. Fonte: fotografias do autor.

Estudos recentes com marcadores moleculares sugerem tanto origem monofilética como polifilética de determinadas formaes especiais de *F. oxysporum*. Entretanto, isso ainda é uma matéria de muita discussão, como é o caso de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. A análise de 165 isolados desse patógeno da bananeira, feita por Koenig et al. (1997), dividiu a maioria das linhagens em dois grupos distintos geneticamente, sugerindo uma origem polifilética da espécie e que a patogenicidade é um fenótipo adquirido de forma independente. Já no trabalho de Nel et al. (2006), os três isolados patogênicos avaliados, oriundos de regiões geo-

gráficas distintas, apresentaram similaridade genética, enquanto 60 isolados não patogênicos, ao contrário, foram geneticamente distintos.

Estirpes patogênicas e não patogênicas de *F. oxysporum* podem viver na rizosfera das plantas ou como saprofítico no solo e nesse caso, até por vários anos na ausência do hospedeiro, nas formas de micélio ou como clamidósporo (AGRIOS, 2005). Os padrões de colonização da superfície radicular são similares entre isolados patogênicos e não patogênicos, como constataram Olivain & Alabouvette (1997) na interação de tomateiro com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

A ampla ocorrência de estirpes não patogênicas no solo indica que formas patogênicas de *F. oxysporum* podem se originar dos primeiros. Essa adaptação ecológica do fungo provém da seleção de variações genéticas de *F. oxysporum* habitantes da rizosfera - a princípio inócuos à futura planta hospedeira - que permitiram ao fungo invadir o córtex e o xilema do hospedeiro e causar doença (GORDON & MARTYN, 1997).

A importância de *F. oxysporum* como patógeno vegetal está relacionada a dois fatores: o primeiro se refere ao hospedeiro vegetal: a complexidade genética da resistência a esse patógeno torna difícil o trabalho de melhoramento de plantas. O segundo se refere ao patógeno: *F. oxysporum* pode persistir no solo por um longo período de tempo como conídio, na superfície radicular do hospedeiro vegetal, ou como clamidósporo, em estágio dormente na ausência do hospedeiro. Isso justifica o interesse na investigação das bases genéticas de resistência de plantas a esse importante patógeno na agricultura (BERROCAL-LOBO & MOLINA, 2008).

3.1. Como *Fusarium oxysporum* ataca as plantas

Pesquisas na área da biologia molecular, associadas a observações citológicas e de alterações morfológicas nos tecidos vegetais do hospedeiro, têm ajudado na elucidação dos passos do processo de infecção por *F. oxysporum* e das reações de defesa do hospedeiro vegetal. O patossistema tomateiro - *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* é um dos mais utilizados nas pesquisas de expressão de genes e mudanças estruturais e bioquímicas.

No artigo de Di Pietro e co-autores (2003) são apresentados 15 genes até então conhecidos em 2003 e que estão relacionados com o processo de infecção por *F. oxysporum*. Os estudos foram realizados pelo método de nocaute de genes, ou seja, inativação de um ou mais genes cuja função acredita-se estar relacionada à patogênese, gerando mutantes incapazes de expressar um determinado fenótipo, que são

comparados com isolados do tipo selvagem (RECORBET et al., 2003; DI PIETRO et al., 2003).

Podem ser enumerados os seguintes passos no processo de estabelecimento de *F. oxysporum* no hospedeiro vegetal (DI PIETRO et al., 2003; RECORBET et al., 2003):

- reconhecimento da proximidade de raízes sem contato físico, por meio de sinais moleculares ainda desconhecidos;
- germinação de conídios e colonização da superfície celular;
- fixação e diferenciação da hifa especializada de penetração na superfície radicular;
- penetração do córtex radicular e degradação de barreiras físicas do hospedeiro, permitindo o alcance do tecido vascular;
- adaptação aos tecidos internos do hospedeiro, permitindo superar as respostas de defesa da planta e tolerar os compostos antifúngicos;
- desenvolvimento de hifas e produção de microconídios que são transportados dentro dos vasos de xilema;
- secreção de determinantes de virulência como peptídeos e fitotoxinas.

Os sintomas característicos de murcha surgem devido ao estresse hídrico da planta, em decorrência da obstrução dos vasos de xilema. Cabe destacar que além de *Fusarium*, a murcha vascular de plantas causada por fungos é restrita somente a outros três gêneros: *Ceratocystis*, *Ophiostoma* e *Verticillium* (AGRIOS, 2005). A obstrução do transporte de água e nutrientes das raízes para a parte aérea é oriunda da combinação do crescimento do patógeno; pelo acúmulo de micélio nos vasos de xilema e produção de toxinas; e de respostas de defesas do hospedeiro, como produção de géis, gomas e tiloses e pelo estreitamento dos vasos de xilema devido à proliferação de células do parênquima (DI PIETRO et al., 2003; RECORBET et al., 2003; LESLIE & SUMMEREL, 2006).

A fase crítica do processo de colonização pelo patógeno parece ser a transposição da parede celular, uma barreira física de defesa do hospedeiro vegetal. Para poder degradar os componentes da parede celular, *F. oxysporum* utiliza um arsenal enzimático, secretando poligalacturonases, pectato liases, xilanases e proteases. As duas primeiras enzimas estão envolvidas na degradação de pectinas, polissacarídeos que representam fração considerável da parede celular das plantas; xilanases causam a despolimerização de xilanas, um tipo de hemicelulose, enquanto proteases são enzimas capazes de degradar proteínas componentes da parede celular (TAIZ & ZEIGER, 2002; DI PIETRO et al., 2003; AGRIOS, 2005).

Além de superar a parede celular, *F. oxysporum* precisa driblar outros mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos para poder colo-

nizar o hospedeiro. O avanço das hifas do patógeno pode ser impedido por géis vasculares e tiloses no xilema, reação que, como exposto anteriormente, contribui para o processo de obstrução dos vasos e conseqüente murcha. Em tomateiros, há produção de compostos antifúngicos, de proteínas relacionadas à patogênese e mesmo acúmulo de enxofre elementar no xilema de tomateiros infectados. Essa mesma espécie vegetal produz a saponina α -tomatina, que reage com esteróis nas membranas celulares do fungo (ARNESON & DURBIN, 1968); em contra-ataque, *F. oxysporum* possui estratégias como modificação do teor de esterol da membrana e secreção de tomatinase, enzima capaz de degradar a α -tomatina (DI PIETRO et al., 2003). A importância dessa enzima fúngica para a patogenicidade de *F. oxysporum* é clara, mas o papel dela ainda é assunto de discussão, pois parece estar relacionada à nutrição (RECORBET et al., 2003) ou pode também estar envolvida na supressão de processos de sinalização da resistência vegetal (DI PIETRO et al., 2003).

Outra estratégia de defesa contra o patógeno foi constatada por Madri et al. (2003). Esses pesquisadores identificaram o gene *chsV*, codificador de quitina sintase classe V, uma proteína integral da membrana celular que tem como função catalisar a polimerização de poli- β (1,4)-N-acetil-D-glucosamina para quitina. Esse polímero de carboidratos, junto com outros dois (β -1,3-glucana, e α -1,3-glucana), são constituintes estruturais, responsáveis pela rigidez da parede celular fúngica (SCHOFFELMEER et al., 1999). Assim, a expressão do gene *chsV* é determinante para a patogenicidade, uma vez que a produção de quitina é uma defesa estrutural que previne o contato de compostos antifúngicos aos respectivos alvos nas células fúngicas (MADRI et al., 2003).

3.2. Como as plantas se defendem de *Fusarium oxysporum*

As plantas impedem ou suprimem o ataque de patógenos por meio de estratégias de defesa pré-existentes ou induzidas, que podem ser de natureza estrutural ou química. Paredes celulares espessas e mais resistentes são barreiras físicas pré-existentes que podem inibir o avanço de patógenos; exsudatos radiculares podem ter ação fungitóxica e representam uma forma de defesa química (AGRIOS, 2005). As defesas induzidas são respostas à presença do patógeno, acionadas pelo reconhecimento de elicitores, moléculas oriundas do microorganismo patogênico ou de compostos liberados da parede celular da planta, por ação de enzimas extracelulares. Os elicitores agem como sinais bioquímicos

externos, perceptíveis na membrana celular da planta, que ativam rotas de sinais internos e a expressão de genes. As principais respostas de defesa induzidas são modificações na parede celular, produção de metabólitos secundários, especialmente pela ativação da rota de fenilpropanóides, e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese, como quitinases, β -1,3-glucanases e quitosanases (AGRIOS, 2005).

De acordo com o patossistema, a resistência do hospedeiro vegetal pode ser controlada por um gene (monogênica), por poucos (oligogênica) ou por múltiplos genes (multigênica). Em *Arabidopsis thaliana*, a planta-modelo em estudos moleculares, a resistência é uma característica oligogênica (BERROCAL-LOBO & MOLINA, 2008). Cruzando ecótipos resistente e suscetível a *F. oxysporum* f. sp. *matthioli*, Diener & Ausubel (2005) identificaram seis locos de resistência ao patógeno (denominados RFO_n), dos quais o de maior contribuição foi RFO1. A resistência mediada por RFO1 não demonstrou ser raça-específica, uma vez que plantas suscetíveis que receberam o alelo RFO1 também foram resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *raphani*. Esse gene parece codificar um receptor do tipo quinase que não contém um domínio extracelular rico em leucina (DIENER & AUSUBEL, 2005).

Nos patossistemas tomateiro - *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* e melão - *F. oxysporum* f.sp. *melonis*, o trabalho de Huertas-González et al. (1999) sugere a presença de uma interação gene-a-gene. Nesses casos, a resistência é regulada por genes *R*, que codificam proteínas capazes de reconhecer a presença de compostos específicos originados do patógeno. Os genes correspondentes, responsáveis pela produção desses compostos são denominados de genes de avirulência (Avr) (AGRIOS, 2005). A resistência a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiro, conferida pelos locos *I*, varia entre as raças específicas do patógeno. O loco *I*-3 atua no reconhecimento de uma proteína secretada pelo patógeno durante a invasão do xilema, codificado pelo gene *Six1*, sugerindo que esse corresponde a uma proteína Avr (REP et al., 2004; BERROCAL-LOBO & MOLINA, 2008).

Os exemplos acima mostram a variabilidade de formas de regulação da resistência de plantas a *F. oxysporum*, que pode ser mediada por múltiplos genes ou por interações gene-a-gene, pelo reconhecimento de elicitores ou proteínas Avr, respectivamente (BERROCAL-LOBO & MOLINA, 2008). Esses autores resumem os processos bioquímicos de reconhecimento e ativação de genes de resistência em *A. thaliana* nos seguintes passos (Figura 2):

(a) reconhecimento de elicitores fúngicos ou *PAMPs* (*pathogen*-

associated molecular patterns, padrões moleculares associados a patógenos) por proteínas receptoras ancoradas na membrana plasmática, como RFO1, induzindo rotas de sinalização no interior da célula;

(b) ativação de canais de Ca^{2+} e aumento da concentração desse íon no citoplasma acionam a ativação de NADPH oxidases e peroxidases, que levam à produção de peróxido de hidrogênio e queima oxidativa;

(c) uma cascata de sinais do tipo MAP-quinases (*mitogen activated protein kinases* - proteíno-quinases ativadas por mitógenos) ativa rotas de defesa celular mediadas por ácido salicílico, etileno, ácido jasmônico ou ácido abscísico;

(d) as rotas de transdução de sinais reguladas por esses hormônios controlam a expressão de genes de defesa contra *F. oxysporum*, por meio de fatores de transcrição.

Fator de transcrição é qualquer grupo de proteínas capaz de se ligar à molécula de DNA durante o processo de transcrição e regular a atividade de RNA polimerases (ATTWOOD, 2006). As proteínas ERF (*ethylene response factor*) formam um grupo de fator de transcrição que atua diretamente na ativação ou inibição de respostas de defesa, regulando genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese e enzimas relacionadas à síntese de metabólitos secundários.

A queima oxidativa é uma estratégia que, igualmente nas folhas, causa a morte celular e limita de forma rápida a o crescimento do patógeno no local de infecção (OKUBARA & PAULITZ, 2005). Fitotoxinas podem atuar como elicitores na expressão de genes relacionados à queima oxidativa. NADPH oxidase e peroxidase, enzimas que atuam na defesa contra patógenos, também estão relacionadas com essa estratégia de restrição do avanço do patógeno. A produção de espécies reativas a oxigênio, dependendo do patossistema, pode contribuir ou impedir o desenvolvimento de *F. oxysporum*, mostrando que esse processo não está claro (BERROCAL-LOBO & MOLINA, 2008).

Junto com a produção de espécies reativas a oxigênio, as rotas de sinalização de ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico atuam na ativação de resistência a *F. oxysporum* em *A. thaliana*. Ácido salicílico, por exemplo, regula a indução de resistência sistêmica adquirida, promovendo a resistência em partes distantes do ponto de infecção e de invasão dos tecidos radiculares e a produção de proteínas relacionadas à patogênese. Ácido abscísico apresenta resultados contraditórios, de modo que não está claro o papel desse hormônio na resistência de *A. thaliana* (BERROCAL-LOBO & MOLINA, 2008).

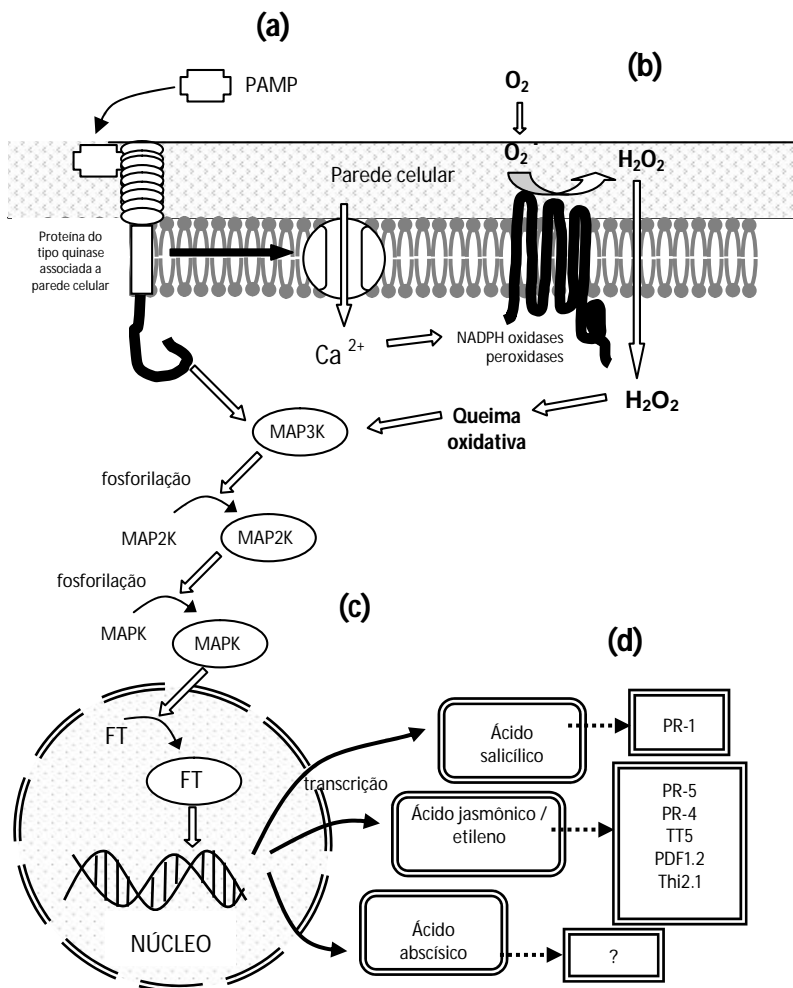


Figura 2. Reconhecimento de *Fusarium oxysporum*, sinalização intracelular, rotas de transdução de sinais e produtos gênicos envolvidos nas respostas de resistência de *Arabidopsis thaliana* ao patógeno, de acordo com o entendimento atual. MAP3K: MAP-quinase quinase quinase; MAP2K: MAP-quinase quinase; MAPK: MAP-quinase. FT: fator de transcrição. PR: proteína relacionada a patogênese. PR-1: função desconhecida; PR-5: similar a taumatina; PR-4: do tipo quitinase; TT5: transparent testa 5, do tipo chalcona isomerase; PDF1.2: proteína antifúngica de baixa massa molecular rica em cisteína; THI2.1: proteína do tipo tionina, capaz de se ligar a receptor de toxina. Adaptado de Berrocal-Lobo & Molina (2008), com informações adicionais de iHOP (2010) e Kersten & Nagel (2010).

Por outro lado, Okubara & Paulitz (2005) afirmam que a resistência sistêmica adquirida mediada por ácido salicílico não é induzida por patógenos radiculares e as resposta de defesa em raízes são dependentes de ácido jasmônico e etileno, que conferem resistência geral e relativamente fraca. Estudos poderão esclarecer essa questão, e como destacam esses autores, apenas um pequeno número de rotas de defesa e mecanismos de resistência já descritos para interações com patógenos na parte aérea foi registrado em raízes.

Trabalhos revisados por Berrocal-Lobo & Molina (2008) indicam que as proteínas heterotriméricas G também fazem parte da resistência a *F. oxysporum* em *A. thaliana*. Essas proteínas são compostas por três subunidades (α , β , γ) e ocorrem na superfície interna da membrana plasmática, transmitindo diversos sinais externos “captados” por receptores na superfície externa da célula. Essas proteínas também regulam diversas rotas de sinalização, como aquelas mediadas por auxina, giberelina e ácido abscísico (TAIZ & ZEIGER, 2002; BERROCAL-LOBO & MOLINA, 2008). Entretanto, a base molecular da resistência mediada por proteínas G é desconhecida, mas demonstrou ser independente das rotas reguladas por ácido salicílico e etileno (BERROCAL-LOBO & MOLINA, 2008).

O reconhecimento do patógeno e a ativação de rotas de transdução de sinais levam à expressão de genes relacionados à resistência e conseqüente produção de compostos capazes de evitar ou restringir a colonização de tecidos no hospedeiro. Na “frente de combate”, barreiras físicas ou químicas são usadas como estratégias contra *F. oxysporum*; Okubara & Paulitz (2005) citam como exemplos, produção de metabólitos antimicrobianos, inativação de toxinas e enzimas líticas e ativação de respostas de defesa a partir de elicitores provindos do patógeno.

No trabalho de Olivain & Alabouvette (1997) é apresentado um exemplo de barreira física. Observações citológicas do processo de infecção de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, feitas durante 10 dias, constatarem o espessamento de parede celular e deposições intra e intercelular sobre a hifa do patógeno. Comparando o processo de colonização radicular de isolados patogênicos e não patogênicos, esses autores verificaram que a diferença está na superação de barreiras de defesa do hospedeiro vegetal: o isolado não patogênico foi impedido de avançar, enquanto para o isolado patogênico tais barreiras foram descontínuas e formadas tarde o suficiente para que o fungo pudesse transpor tal estratégia de defesa. Eles concluíram que os fenômenos decisivos para o sucesso ou falha de uma infecção vascular são a dinâmica de reações de defesa e a eficiência ou não das barreiras criadas para prevenir o fungo

de alcançar o sistema vascular. Além disso, concluíram que as diferenças parecem ser de uma natureza mais quantitativa que qualitativa.

Em trabalho semelhante, Trillas et al. (2000) conduziram observações citológicas na interação de cravo (*Dianthus caryophyllus*) com raças compatíveis e incompatíveis de *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*. A interação incompatível induziu o acúmulo de calose nas células próximas àquelas invadidas pelo patógeno, reforçando a parede celular a fim de proteger das enzimas fúngicas e restringir o crescimento do patógeno.

Um exemplo de barreira química contra *F. oxysporum* é α -tomatina (RECORBET et al., 2003). Como já foi destacado anteriormente, o efeito fungitóxico direto dessa saponina é relacionado à interação com esteróis da membrana celular do fungo. A fitoalexina rishitin é outro exemplo de metabólito secundário produzido pelo tomate e de efeito fungitóxico a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (RECORBET et al., 2003).

Quitinases e β -1,3-glucanases são proteínas associadas à defesa das plantas contra *F. oxysporum*. Estas enzimas degradam os polissacarídeos quitina e β -1,3-glucana, respectivamente (LEBEDA et al., 2001), que estão entre os principais componentes da parede celular de *F. oxysporum* (SCHOFFELMEER et al., 1999). Além da ação direta sobre os respectivos substratos, a atividade de quitinases e β -1,3-glucanases possivelmente gera elicitores capazes de ativar outras respostas de defesa no hospedeiro (RECORBET et al., 2003).

Ainda sobre essas duas enzimas, é interessante destacar o trabalho de Benhamou et al. (1990) com a interação tomateiro - *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Os autores publicaram a primeira evidência *in vivo* de que quitinases acumula-se em torno da hifa de *F. oxysporum*, sugerindo que essas enzimas possuem uma atividade antifúngica. Além disso, os autores constataram um acúmulo da enzima em áreas de parede fúngica já alteradas, indicando que a atividade de quitinases foi precedida pela ação hidrolítica de outras enzimas, como β -1,3-glucanases. Nesse caso a ação de β -1,3-glucanases pode ter produzido elicitores que induzirem a produção de quitinases. A deposição extracelular de quitinases permite um contato rápido com o patógeno, uma vez que β -1,3-glucanases torna a quitina acessível à ação enzimática.

Em trabalho anterior conduzido por Benhamou et al. (1989), o acúmulo da β -1,3-glucanases em tecidos não infectados de plantas resistentes foi relacionado à limitação da expansão do patógeno. Benhamou et al. (1990) concluem que quitinases e β -1,3-glucanases desempenham papéis diferentes na defesa: a indução de β -1,3-glucanases se mostra

como um evento primário associado com a defesa do hospedeiro contra a invasão fúngica, enquanto o acúmulo de quitinases representa uma resposta bioquímica a elicitores fúngicos liberados pela ação de β -1,3-glucanases.

Os trabalhos acima, utilizando plantas mutantes, recursos da biologia molecular e observações citológicas de interações compatíveis e incompatíveis com estirpes de *F. oxysporum*, são exemplos que dão uma mostra do entendimento sobre o processo de infecção do patógeno e as interações desse com os respectivos hospedeiros vegetais. A maioria dos autores, especialmente aqueles que fizeram revisões sobre os temas abordados acima (BERROCAL-LOBO & MOLINA, 2008; DI PIETRO et al., 2003; RECORBET et al., 2003) destacam a necessidade de maiores trabalhos para a compreensão dos processos bioquímicos e moleculares envolvidos na interação entre *F. oxysporum* e plantas de interesse ao ser humano. Por fim, essas informações podem ajudar no desenvolvimento de estratégias de controle e diminuição de prejuízos causados por um patógeno do solo de distribuição cosmopolita e de controle difícil.

4. Micorrizas arbusculares

4.1. Aspectos gerais

As micorrizas são associações mutualísticas de ocorrência geral na natureza, na qual raízes de plantas são invadidas por fungos específicos, ocorrendo uma perfeita integração funcional entre os simbiontes (SMITH & READ, 1997). A definição de micorrizas como sendo “órgãos duplos de absorção formados quando fungos simbiontes habitam órgãos de absorção saudáveis (raízes, rizomas, talos) da maioria das plantas terrestres e de muitas aquáticas e epífitas”, elaborada por Trappe (1996), parece ser a melhor de todas. São englobadas a função e a estrutura da simbiose e considera somente as simbioses mutualísticas, pelo uso do termo ‘saudáveis’, de modo que em situações contrárias, se apresenta uma associação parasítica.

Existem vários tipos de micorrizas, de acordo com a taxonomia fúngica, características morfológicas, forma de colonização de tecidos radiculares e família do simbionte vegetal, por exemplo. Os principais tipos são: micorrizas arbuscular, arbutóide, monotropóide, ericóide e orquidóide; ectomicorriza; e ectoendomicorriza (SMITH & READ, 2008). A micorriza do tipo arbuscular constitui a mais importante simbiose da Terra, ocorrendo em 80% das famílias de plantas vasculares

(ALLEN, 1996). O nome ‘arbuscular’ deriva de arbúsculos, estruturas características que ocorrem dentro das células do córtex nas raízes de plantas; algumas espécies de FMA formam vesículas dentro das raízes, estruturas ricas em lipídios que tem a função de estocar reservas energéticas (Figura 3) (SMITH & READ, 2008). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) recentemente foram objeto de revisão taxonômica por Schüssler et al. (2001). Por meio de análise filogenética de subunidade do RNA ribossômico, os autores classificaram-nos em um único grupo monofilético – Glomeromycota –, ao mesmo nível taxonômico dos fungos ascomicetos e basidiomicetos.

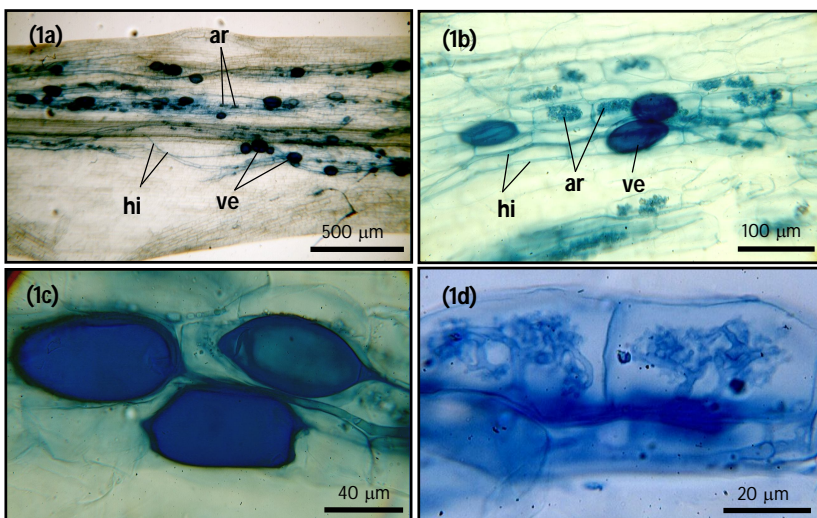


Figura 3. Estruturas típicas de fungo micorrízico arbuscular. 1a e 1b: arbúsculos (ar), hifas intrarradiculares (hi) e vesículas (ve) de *Glomus intraradices* em associação com tecidos radiculares de videira. 1c: detalhe de vesícula de *Glomus intraradices*. 1d: detalhe de arbúsculos em células do córtex radicular. Fonte: fotografias do autor.

A existência de associações micorrízicas é tão antiga quanto as plantas terrestres. A evolução dos fungos micorrízicos atuais e os hospedeiros vegetais se confundem: registros fósseis indicam que o surgimento de micorrizas do tipo arbuscular ocorreu há pelo menos 400 milhões de anos (REMY et al., 1994), estimativa recuada em 60 milhões de anos pelo trabalho de Redecker et al. (2000), em época anterior a existência de plantas vasculares. Ambas as investigações sugerem que o

sucesso da colonização do ambiente terrestre dependeu dessa simbiose.

A associação formada entre plantas e FMA pode ser definida como uma endossimbiose, interação na qual microorganismos vivem parcialmente ou inteiramente dentro de células vegetais após a penetração de células vivas do hospedeiro vegetal (PARNISKE, 2000). Seguindo esse conceito, também são consideradas endossimbioses as associações entre bactérias fixadoras de nitrogênio, genericamente chamadas de rizóbios, e fungos patogênicos biotróficos, como espécies dos gêneros *Puccinia* e *Erysiphe* (PARNISKE, 2000).

Há uma baixa especificidade na associação entre FMA e plantas hospedeiras, pois existe em torno de 150 espécies de fungos identificados para um número muito superior de plantas que podem formar micorriza arbuscular (ALLEN et al., 1995), o que possibilita a associação de uma planta com mais de uma espécie de FMA e vice-versa. Como os FMA são biotróficos obrigatórios, necessitam de um hospedeiro vegetal vivo para produzir estruturas reprodutivas viáveis, não sendo possível, dessa forma, realizar a multiplicação e produção de esporos em condições *in vitro* com meios de cultura nutritivos.

O estabelecimento de micorrizas funcionais envolve vários eventos. Por meio de sinais bioquímicos, como flavonóides, presentes no exsudatos radiculares de plantas hospedeiras, os esporos de FMA são estimulados a germinar e ramificar as primeiras hifas em direção da raiz (REQUENA et al., 2007). Na superfície da raiz, os FMA formam apresórios para poder penetrar no espaço entre as células da epiderme. Hifas do fungo ramificam-se e colonizam o córtex radicular. Na região interna desse tecido, uma hifa degrada a parede celular e forma o arbúsculo, estrutura ramificada a que se atribui a função de sítio de troca de nutrientes entre os dois simbioses. Com a colonização do córtex radicular, o fungo desenvolve hifas dentro do solo para acessar os nutrientes do solo e translocá-los à planta, colonizar raízes do mesmo hospedeiro ou de outra planta e produzir esporos (HARRISON, 1999; SMITH & READ, 2008).

A membrana plasmática das células do córtex não é rompida e forma invaginações em torno das ramificações que formam o arbúsculo, de maneira que o fungo não mantém contato direto com o citoplasma vegetal. O arbúsculo é cercado pela membrana periarbuscular, que é contínua à membrana plasmática; a interface formada entre a membrana plasmática do fungo e a membrana periarbuscular compreende componentes das paredes celulares dos simbioses e é denominada espaço periarbuscular (Figura 4) (HARRISON, 1999; SMITH & READ, 2008; PARNISKE, 2008).

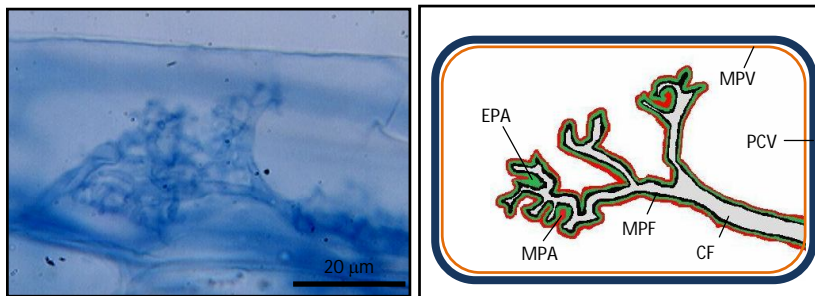


Figura 4. Arbúsculo de *Glomus intraradices* em associação com tecidos radiculares de videira e representação esquemática de estruturas envolvidas na interface da simbiose entre células radiculares e fungos micorrízicos arbusculares. MPV: membrana plasmática vegetal; PCV: parede celular vegetal; CF: citoplasma do fungo micorrízico; MPF: membrana plasmática do fungo micorrízico; MPA: membrana periarbuscular; EPA: espaço periarbuscular. Adaptado de Parniske (2008). Fonte: fotografia do autor.

Os eventos de troca de sinais bioquímicos, modificações morfológicas na planta hospedeira e organização celular dos FMA são determinados por alterações específicas na expressão de genes dos simbiontes (BALESTRINI & LAFRANCO, 2006). Na revisão elaborada por esses autores, são mostrados os principais avanços nos últimos 10 anos sobre o conhecimento da expressão de genes fúngicos e vegetais que permitem a integração entre os simbiontes e a atividade funcional de micorrizas arbusculares.

A propriedade de um tipo de FMA poder colonizar diversas espécies vegetais permite a formação de uma rede de hifas que interconecta sistemas radiculares, por onde se translocam nutrientes entre plantas. Essas ‘pontes biológicas’ possuem um senso estratégico ao FMA, servindo para a expansão do fungo no solo e para a absorção de carbono de uma forma mais eficiente, por meio da colonização ativa de raízes, garantindo seu contínuo crescimento e atividade (HODGE, 2000). Técnicas isotópicas têm demonstrado a transferência de nitrogênio e fósforo de leguminosas para gramíneas, através de hifas de FMA que interconectam essas espécies (JOHANSEN & JENSEN, 1996; CRUZ & MARTINS, 1997). O trabalho de Cheng & Baumgartner (2004) demonstrou a transferência de ^{15}N de plantas de cobertura do solo (*Bromus hordeaceus* e *Medicago polymorpha*) para videiras.

4.2. Micorrizas e o status nutricional do hospedeiro vegetal

O papel das associações micorrízicas na nutrição vegetal, em especial na absorção de fósforo, está bem comprovado. Em troca de fotossintatos - usados como fonte de energia para a formação, manutenção e funcionamento das estruturas micorrízicas - até 80% do fósforo das hifas de FMA podem ser disponibilizados ao metabolismo vegetal (MARSCHNER & DELL, 1994). As trocas carbono-fósforo ocorrem principalmente nos arbúsculos (HARRIER, 2001). O fósforo da solução do solo, absorvido por meio de transportador de fosfato nas hifas extrarradiculares, é condensado em polifosfato e translocado pelo protoplasma do fungo até as hifas intrarradiculares, onde será hidrolisado e liberado como fosfato para a planta através da membrana do arbúsculo (SOLAIMAN & SAITO, 2001). O carbono é transferido da planta para o fungo na forma de hexoses; nas hifas intrarradiculares, essas são convertidas em triacilglicerídeo e glicogênio, carboidratos típicos do fungo, que são translocados às hifas extrarradiculares (BAGO et al., 2003).

A aquisição de fósforo pelas hifas externas dos FMA e sua mobilização à planta está relacionada a diversos mecanismos de ações físicas, químicas ou biológicas. Micorrizas estendem a zona de absorção para áreas mais distantes do sistema radicular, aumentando sua área superficial específica, diminuindo as distâncias do fluxo difusivo dos íons ortofosfato e interceptando a fixação de fósforo após a mineralização e a solubilização mediada por outros microrganismos do solo (BOLAN, 1991; JONER et al., 2000; MARSCHNER & DELL, 1994).

A resposta à inoculação com FMA e o papel nutricional das associações micorrízicas em videiras estão bem descritos em trabalhos com avaliação de porta-enxertos, multiplicados por meio de estaquia ou micropropagados, e em mudas enxertadas. Videiras inoculadas com FMA apresentaram incrementos no crescimento e no acúmulo de massa da matéria seca da parte aérea (SCHUBERT et al., 1988; KARAGIANNIDIS et al., 1995; BAVARESCO & FOGHER, 1996a; LINDERMAN & DAVIS, 2001; NIKOLAOU et al., 2002; NIKOLAOU et al., 2003; AGUÍN et al., 2004; CAMPRUBÍ et al., 2008); aumento no teor de nutrientes como fósforo (KARAGIANNIDIS et al., 1995; NIKOLAOU et al., 2003), nitrogênio (NIKOLAOU et al., 2002), potássio (NIKOLAOU et al., 2002; KARAGIANNIDIS et al., 2007), cálcio (NIKOLAOU et al., 2002) e boro (NIKOLAOU et al., 2002; KARAGIANNIDIS et al., 2007).

Além disso, a micorrização de videiras pode aumentar a tolerância ao estresse hídrico (NIKOLAOU et al., 2003) e a clorose causada

pela alcalinidade de solos da Itália (BAVARESCO & FOGHER, 1996b). A inoculação de FMA também pode promover alterações na arquitetura radicular de videiras (AGUÍN et al., 2004). Os benefícios da inoculação de FMA em condições de estresse indicam que a videira apresenta alta dependência à formação de micorrizas (BIRICOLTI et al., 1997; LINDERMAN & DAVIS, 2001). Esses estudos, mesmo que em situações controladas, demonstram a importância da associação micorrízica no contexto de sistemas de produção agrícola.

Os benefícios de uma associação micorrízica funcional demonstram a viabilidade de uso dessa biotecnologia em produção de mudas de videira. A inoculação de FMA durante a aclimatização de plantas micropropagadas pode diminuir o tempo para produção e a mortalidade na fase de transição das condições *in vitro* para *ex vitro*. Nessa passagem de condições heterotróficas para autotróficas, a associação micorrízica melhora o status nutricional e fisiológico das mudas, permitindo maior absorção e acúmulo de nutrientes (ZEMKE, 2003; KRISHNA et al., 2005).

4.3. Micorrizas e a expressão de genes de defesa da planta

Durante o processo de integração ou acoplamento e acomodação de FMA na raiz da planta hospedeira, uma fase crítica - ao que indicam os trabalhos revisados - e a mais interessante - em relação ao objetivo deste trabalho de tese - é a regulação da expressão de genes de defesa da planta. Como será visto abaixo, a planta hospedeira precisa reconhecer o fungo micorrízico para permitir a invasão e colonização dos tecidos radiculares. Do contrário, interpreta a presença do fungo como sendo de um patógeno. Um sistema intricado de troca de sinais e respostas bioquímicas ocorre no estabelecimento da simbiose, envolvendo a expressão dos chamados ‘genes de simbiose’ na planta e emissão de sinais simbióticos pelo fungo. Isso possibilita a regulação da expressão de genes de defesa da planta e a sincronização das mudanças morfológicas e fisiológicas no hospedeiro vegetal, fazendo assim com que o hospedeiro vegetal “baixe a guarda” e permita o estabelecimento e acomodação dos FMA.

A expressão de genes e a ativação de rotas metabólicas relacionadas a respostas de defesa por FMA em interações compatíveis com plantas foram alvos de várias revisões (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996a; GARCÍA-GARRIDO & OCAMPO, 2002; POZO et al., 2002b; HAUSE & FESTER, 2005). De maneira geral, essa expressão é fraca, sem coordenação, temporária e localizada quando comparada a intera-

ções entre plantas e patógenos (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996a).

Nos primeiros contatos, na troca de sinais entre simbiontes, a presença de FMA induz a produção de superóxido-dismutase e peroxidase, representantes do metabolismo de espécies reativas a oxigênio. Ao mesmo tempo, são ativados genes que codificam para enzimas da rota de fenilpropanóides e para proteínas relacionadas à patogênese. No primeiro caso, é induzida a produção das enzimas fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase e de compostos fenólicos de atividade antimicrobiana, como fitoalexinas, e no segundo caso, enzimas como proteases, quitinases e β -1,3-glucanases. Nas duas situações, quando comparados às interações patogênicas, a ativação é transiente, localizada e fraca (GARCÍA-GARRIDO & OCAMPO, 2002; POZO et al., 2002b).

Plantas hospedeiras mutantes (myc-), incapazes de progredir no estabelecimento da associação micorrízica em determinada fase do processo, são utilizadas em trabalhos de investigações citológicas e moleculares, visando compreender os processos envolvidos na ativação/supressão de genes de defesa das plantas. (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996a; GARCÍA-GARRIDO & OCAMPO, 2002). O gene *Mt-chs1*, que codifica a enzima chalcona sintase, foi induzido no primeiro contato do fungo micorrízico *Glomus intraradices* com a superfície radicular de *Medicago truncatula*, antes mesmo da formação do apressório (BONANOMI et al., 2001). Volpin et al. (1995) constataram aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase, chalcona isomerase e quitinases em raízes de alfafa, antes da colonização micorrízica por *G. intraradices*. O aumento temporário na produção de quitinases e β -1,3-glucanases representa uma resposta de defesa primária da planta frente à presença de um fungo invasor dos tecidos radiculares. A subsequente supressão dessas enzimas ocorre com o desenvolvimento da simbiose (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996a).

Em relação à indução de defesas estruturais, FMA não causam modificações significantes na parede de células epidérmicas (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996a), como a deposição de calose observada nos sítios de infecções por agentes patogênicos (AGRIOS, 2005). Ervilhas mutantes, em reações incompatíveis com FMA, podem impedir a infecção micorrízica bloqueando o avanço do apressório, reforçando as barreiras físicas da parede celular com calose e compostos fenólicos; tal defesa induzida é semelhante à reação frente a um patógeno (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996a; GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996b). Isso indica que, por meio de genes específicos, as plantas controlam o desenvolvimento da associação micorrízica (GIANINAZZI-

PEARSON et al., 1996a; HARRISON, 1999), tornando restrito às células do córtex o desenvolvimento e avanço das estruturas do fungo, que não alcançam outros tecidos do hospedeiro vegetal (GIANINAZZI-PEARSON, 1996).

Depois da indução transiente e fraca de defesa da planta, na fase seguinte, em que ocorrem o estabelecimento final e a funcionalidade da associação micorrízica pela formação dos arbúsculos, a ativação de respostas de defesa torna-se mais forte, mas restrita às células contendo essa estrutura fúngica (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996a; GARCÍA-GARRIDO & OCAMPO, 2002). Nesse caso, esses autores destacam acúmulos de genes codificando glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, enzimas do metabolismo de fenilpropanóides e relacionadas à produção de espécies reativas a oxigênio, por exemplo.

O estudo de Lambais & Mehdy (1998), analisando o acúmulo de RNA mensageiro em tecido radiculares de feijoeiros, relacionou a regulação da simbiose com o status nutricional no hospedeiro. Os autores sugerem que a produção de quitinases em plantas micorrizadas está envolvida na restrição do crescimento intrarradicular do fungo em condições de alta concentração de fósforo no solo. Por outro lado, o acúmulo de β -1,3-glucanases em condições de baixa disponibilidade de fósforo no solo indica um papel dessa enzima na degradação da parede celular, facilitando a penetração intracelular do fungo e o aumento da colonização micorrízica.

A função dos compostos gerados pela expressão de genes não está clara. Uma enzima, por exemplo, com atividade frente a substrato específico, pode ter papéis diversos em interações patogênicas e mutualísticas. Isoformas de quitosanases induzidas por FMA em tomateiro não foram observadas na interação entre essa planta e patógeno *Phytophthora parasitica* (POZO et al., 1998). Dessa forma, são geradas moléculas que se ligam a receptores correspondentes na membrana das células vegetais, sensibilizam o interior da célula e ativam uma rota de transdução de sinais até o núcleo, induzindo a expressão de genes relacionados à defesa (GARCÍA-GARRIDO & OCAMPO, 2002). Os FMA induzem a resistência em plantas que naturalmente não formam micorrizas e em plantas mutantes incapazes de formar tal associação por meio de elicitores (POZO et al., 2002b).

Uma hipótese para a atenuação das respostas de defesa da planta em interações compatíveis com FMA é de que enzimas induzidas hidrolisam os elicitores fúngicos e regulam a ativação conseguinte de genes de defesa (GARCÍA-GARRIDO & OCAMPO, 2002). Em plantas micorrizadas de *M. truncatula*, Salzer et al. (2000) constataram a indução

de quitinases específicas e sugerem que essas enzimas estão relacionadas com a clivagem de elicitores do fungo, que atenuaria ou suprimiria as respostas de defesa da planta nos estágios finais de estabelecimento da associação micorrízica. A produção de elicitores endógenos, ocasionada pela degradação da parede celular por enzimas do fungo, parece não ser o caso, pois FMA produzem baixa quantidade desse tipo de enzima. Assim, GARCÍA-Garrido & Ocampo (2002) sugerem que o papel de enzimas fúngicas é apenas de caráter seletivo e específico, mirando componentes da parede celular que permitam a penetração de hifas, não havendo um processo de degradação generalizado, como ocorre em interações patogênicas, e que levaria a produção de elicitores endógenos.

Em paralelo à clivagem de elicitores, o reconhecimento pela célula vegetal de um possível sinal simbiótico fúngico leva à ativação de uma rota simbiótica específica que permite o estabelecimento da simbiose (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996a; GARCÍA-GARRIDO & OCAMPO, 2002). De fato, muitos dos mutantes que falham na formação de micorrizas interagem normalmente com outros microorganismos, indicando a existência de genes específicos no hospedeiro vegetal que regulam a associação micorrízica (POZO et al., 2002b). Em alfafa, a presença do fungo micorrízico *Glomus intraradices* foi capaz de suprimir o gene codificador da enzima isoflavona redutase, a penúltima da biossíntese de medicarpina, composto que se acumula em interações patogênicas do hospedeiro (VOLPIN et al., 1995).

Entretanto, não está claro como a planta faz o controle do desenvolvimento de FMA nos tecidos radiculares (POZO et al., 2002b). A investigação de Liu et al. (2003) mostra um perfil geral dos genes induzidos durante o estabelecimento da associação micorrízica. Utilizando biblioteca de 2.268 DNA complementar da associação entre a planta hospedeira *Medicago truncatula* e o fungo *Glomus versiforme*, esses autores monitoraram o perfil de transcrição em raízes micorrizadas e buscaram desvendar os genes cuja expressão é regulada durante o desenvolvimento da micorriza arbuscular.

Foram encontrados dois padrões de expressão temporais distintos. Em um grupo foi constatado um aumento na expressão de genes durante o período inicial de contato entre os simbioses, seguido de diminuição com a evolução da simbiose. Genes de respostas de defesa e estresse, com similaridade de sequência a quitinases, por exemplo, representaram parte considerável desse grupo (LIU et al., 2003). Esses autores também constataram, dentro desse grupo, alguns genes de resposta de defesa que não mostram um aumento temporário na expressão, mas tem a atividade

regulada pela planta, sendo diminuída com o desenvolvimento da simbiose. Um número de genes desse grupo codifica prováveis componentes de transdução de sinais associados à defesa, como fosfatases e quinases. Assim, há pelo menos dois sinais diferentes que regulam a expressão de genes de defesa em micorrizas arbusculares (LIU et al., 2003). Essa modulação na expressão de genes de defesa, com produção no estágio inicial da simbiose e repressão nas fases seguintes, parece confirmar resultados anteriores de trabalhos independentes revisados por Gianinazzi-Pearson et al. (1996a). Genes no segundo grupo mostraram um aumento contínuo correlacionado com a colonização do sistema radicular. Faziam parte genes de rotas de transdução de sinais, sugerindo que eles ativam rotas de sinalização durante o desenvolvimento da simbiose (LIU et al., 2003).

É importante ressaltar que a percepção de sinais, como elicitores, a transdução de sinais e a ativação de genes de defesa são eventos comuns nas associações mutualísticas e parasíticas. Como foi destacado anteriormente, FMA e patógenos biotróficos são endossimbiontes, por viverem parcialmente dentro de células vegetais vivas. De fato, é possível que todas as endossimbioses compartilhem um programa genético para permitir a acomodação intercelular dos microorganismos, seja em simbioses mutualísticas – micorrizas arbusculares e nódulos fixadores de nitrogênio – ou parasíticas – oídios e ferrugens-, como sugere Parniske (2000). Arbúsculos e haustórios, inclusive, possuem semelhanças morfológicas e funcionais, uma vez que são sítios de fluxo de nutrientes, excetuando-se o fato, é claro, que nessa última interação o trânsito é unidirecional e a planta não obtém nenhum benefício.

Sete grupos de complementação genética, identificados em mutantes de *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* e *Pisum sativum* incapazes de formar micorrizas (myc-) e nódulos fixadores de nitrogênio (nod-) são apresentados por Marsh & Schultze (2001). Os genes comuns para essas duas simbioses mutualísticas são denominados genes SYM. Isso mostra que diversas etapas da expressão de genes na planta são comuns para o estabelecimento de ambas as simbioses. Tais genes de simbiose foram recrutados e parte deles reprogramados para permitir a acomodação intracelular de rizóbios e o funcionamento da simbiose, uma vez que nódulos, que surgiram em torno de 65 milhões de anos atrás, evoluíram em período posterior ao de micorrizas (KISTNER & PARNISKE, 2002).

A comparação de perfis de RNA mensageiro em raízes de arroz colonizadas pelo fungo micorrízico *Glomus intraradices* revelou que 95 dos 224 genes induzidos pela micorriza também foram expressos após

inoculação dos patógenos *Magnaporthe grisea* e *Fusarium moniliforme*. Isso sugere um grau considerável de sobreposição de genes entre as interações mutualística e parasíticas e um padrão de resposta conservado evolutivamente nas infecções de plantas por fungos (GÜMIL et al., 2005).

Resumindo, FMA podem suprimir, impedir ou superar as respostas de defesa para poderem se estabelecer nos tecidos radiculares (POZO et al., 2002b). De acordo com Pozo & Azcón-Aguilar (2007), a modulação das respostas de defesa depende de um balanço nos níveis de ácido salicílico e ácido jasmônico, hormônios que mediam a transmissão de sinais sistêmicos; na fase inicial da infecção micorrízica, ocorre produção de ácido salicílico, que diminui com a colonização do córtex radicular e dá lugar ao ácido jasmônico, que é sintetizado nas células contendo arbúsculos.

Novos arbúsculos são formados continuamente, uma vez que a senescência dessas estruturas ocorre em poucos dias (SMITH & READ, 2008). Como a colonização micorrízica acompanha o crescimento radicular, a expressão de genes de resposta de defesa por micorrizas provavelmente é um fenômeno contínuo na planta. De acordo com Barker et al. (1998), FMA não produzem um sinal bioquímico para ‘desligar’ completamente as respostas de defesa, pois nessa situação, plantas micorrizadas se tornariam suscetíveis ao ataque de patógenos. Micorrizas, ao contrário, podem suprimir patógenos, como será visto a seguir. Seguindo esse raciocínio, o processo de reconhecimento e regulação da expressão de genes é localizado e se repete a cada novo contato do fungo com as células da planta (BARKER et al., 1998). Essa constante expressão de genes e a indução de reações de defesa por FMA estão relacionadas à resistência de plantas contra patógenos (POZO et al., 2002b).

4.4. O efeito supressivo de micorrizas a patógenos do solo

Os benefícios da formação de micorrizas arbusculares no status nutricional do hospedeiro vegetal foram destacados anteriormente. Trabalhos científicos têm comprovado o papel valioso da simbiose na disponibilização de nutrientes ao metabolismo vegetal, especialmente o fósforo, e na superação de estresses, como a deficiência hídrica. Inclusive, estudos avaliaram o grau de deslocamento de nutrientes entre plantas, por meio de pontes de hifas extrarradiculares, trazendo à tona informações interessantes sobre a conservação de fontes prontamente disponíveis de nutrientes dentro dos ecossistemas.

Além desses aspectos relacionados à obtenção de nutrientes e à superação de limitações abióticas do meio, essa simbiose mutualística tem um papel importante na supressão e controle de patógenos radiculares. Por exemplo, em tomate, os danos causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* foram reduzidos com a inoculação de *Glomus intraradices* (CARON et al., 1986) e em linho (*Linum usitatissimum*), a formação de micorrizas aumentou a resistência das plantas ao ataque por *F. oxysporum* f. sp. *lini* (DUGASSA et al., 1996). Feijoeiros micorrizados com *G. mosseae* reduziram o número de propágulos na rizosfera e a podridão da raiz causada por *F. solani* (DAR et al., 1997) e em pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), a inoculação com espécies de FMA reduziram em até 80% a incidência de *F. solani* f. sp. *piperis* (CHU et al., 1997).

A supressão de patógenos do solo por micorrizas arbusculares é uma linha de pesquisa que evoluiu bastante nos últimos tempos, graças aos avanços de técnicas de biologia molecular, empregadas nas avaliações de alteração da expressão de genes e na detecção de moléculas específicas associadas com o controle de doenças (WHIPPS, 2004). Com isso está sendo possível esclarecer questões sobre os modos de ação envolvidos na supressão de patógenos, informações básicas para compreender a interação entre os simbiontes mutualístico e parasíticos e, do ponto de vista prático, para propor estratégias de uso e manejo de micorrizas na agricultura. Como destaca Azcón-Aguilar et al. (2002), FMA possuem um papel importante no controle de doenças radiculares em sistemas de produção agrícola e provavelmente contribuem ao efeito supressivo do solo a patógenos.

Várias revisões recentes abordam questões relacionadas à supressão de ataque de patógenos radiculares e do desenvolvimento de sintomas de doenças por micorrizas arbusculares (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1996; AZCÓN-AGUILAR et al., 2002; XAVIER & BOYETCHKO, 2004; WHIPPS, 2004; VIERHEILIG et al., 2008). Esses trabalhos mostram que micorrizas arbusculares promovem a redução da incidência e severidade de doenças causadas por patógenos do solo como fungos dos gêneros *Fusarium*, *Phytophthora* e *Rhizoctonia* e de bactérias como *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

É interessante destacar que algumas questões sobre o uso de FMA no biocontrole de patógenos radiculares:

- micorrizas arbusculares podem reduzir danos causados por patógenos do solo, mas a eficiência não é igual para todos os patógenos. Além disso, não há controle total de patógenos ou ‘imunização’ de plantas micorrizadas; em geral, constata-se algum tipo de diminuição em um

parâmetro de doença na comparação entre plantas inoculadas e não inoculadas com FMA (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1996; WHIPPS, 2004).

- a inoculação prévia de FMA aos patógenos é regra (WHIPPS, 2004; VIERHEILIG et al., 2008);
- é necessária uma taxa mínima de colonização micorrízica para se obter resultado, por exemplo, acima de 50%, como mostrado no trabalho de Cordier et al. (1998) para a interação tomateiro - *Glomus mosseae* - *Phytophthora parasitica*;
- existe uma eficiência diferente entre espécies de FMA em relação a supressão de patógenos (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1996; VIERHEILIG et al., 2008);
- proteção a patógenos radiculares por micorrizas é regulada pelo solo e outras condições ambientais, inclusive a concentração de inóculo de patógeno, que de acordo com o nível pode anular qualquer forma de biocontrole (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1996);
- é necessário maior número de trabalhos com avaliação a campo da inoculação de FMA, que permitirá comparar resultados com aqueles obtidos em condições controladas e longe da complexidade de interações existentes nos sistemas de produção agrícola (WHIPPS, 2004; XAVIER & BOYETCHKO, 2004).

Os modos de ação e estratégias envolvidos podem ser sintetizados em quatro grupos: competição direta entre FMA e patógenos; regulação da população microbiana no solo em torno do sistema radicular; modificações no crescimento, nutrição e morfologia vegetal; e alterações de ordens bioquímicas e moleculares nos hospedeiros vegetais. Tais modos de ação não atuam isoladamente e o sucesso da supressão de patógenos provém da combinação de efeitos. Por exemplo, a melhoria nutricional do hospedeiro vegetal por micorrizas arbusculares, estudada com mais profundidade em relação ao desempenho no crescimento ou produção de biomassa, também está relacionada com a bioproteção.

4.4.1. Competição direta entre FMA e patógenos

A ocupação de sítios de colonização e do espaço físico nas células radiculares pelas estruturas de FMA pode ser uma forma de supressão de doenças em plantas micorrizadas (AZCÓN-AGUILAR et al., 2002; XAVIER & BOYETCHKO, 2004). Entretanto, esse é um campo que necessita estudos mais aprofundados e não é conclusiva (AZCÓN-AGUILAR et al., 2002). No trabalho de Cordier et al. (1998) foi constatado, por meio de observações citológicas, que *Phytophthora parasitica*

foi incapaz de invadir células radiculares de tomateiro com arbúsculos do fungo micorrízico *Glomus mosseae*.

A disputa por fotossintatos do hospedeiro vegetal entre o fungo mutualístico e patógenos também tem sido relacionada como forma de supressão desses últimos (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1996). Vie-rheilig et al. (2008) descartam esse modo de ação, pois trabalhos revisa-dos por esses autores mostraram que não há relação entre a capacidade dreno de carbono e a bioproteção entre diferentes espécies de FMA.

4.4.2. Regulação da população microbiana no solo

Em plantas micorrizadas, a presença de hifas extrarradiculares pode acarretar em regulação quali e quantitativa da população de bacté-rias e fungos habitantes da rizosfera de plantas micorrizadas (AZCÓN-AGUILAR et al., 2002; XAVIER & BOYETCHKO, 2004). Dessa for-ma, a região da rizosfera sob influência da colonização micorrízica, chamada de micorrizosfera (LINDERMAN, 1988), pode ter a microbio-ta regulada em prol de equilíbrio entre as populações microbianas e, especificamente, à presença de microorganismos antagonistas a patóge-nos.

Em feijoeiros micorrizados com *G. intraradices*, Filion et al. (2003) atribuíram a diminuição da população de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* no solo a modificações indiretas na estrutura das populações microbianas. Em experimento *in vitro* (FILION et al., 1999), o extrato de substâncias solúveis do micélio de *G. intraradices* estimulou o cres-cimento de *Pseudomonas chlororaphis* e a germinação de conídios de *Trichoderma harzianum*, espécies de bactéria e de fungo, respectiva-mente, utilizados no controle biológico de patógenos do solo. Conídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, por outro lado, tiveram a taxa de germinação reduzida, sugerindo competição entre os dois fun-gos. Por outro lado, Green et al. (1999) obtiveram resultados contraditó-rios ao trabalho acima, no qual o micélio extrarradicular de *G. intrara-dices* afetou negativamente o desenvolvimento de *Trichoderma harzia-num*.

4.4.3. Modificações no crescimento, nutrição e morfologia vegetal

Plantas bem nutridas são mais resistentes ou tolerantes a patóge-nos, visto que a melhora do status nutricional de plantas micorrizadas, especialmente pela disponibilidade de fósforo, auxilia na superação ou compensação de danos causados por patógenos (AZCÓN-AGUILAR et

al., 2002). O aumento da capacidade fotossintética pode compensar a perda de biomassa ou de função radicular em plantas atacadas por patógenos, mantendo a absorção de nutrientes pelo crescimento de hifas extrarradiculares e atividade das células radiculares por meio da formação de arbúsculos; dessa forma é atrasada a senescência da planta e aumenta-se a tolerância a agentes patogênicos (AZCÓN-AGUILAR et al., 2002; XAVIER & BOYETCHKO, 2004).

Micorrizas arbusculares também podem promover alterações fisiológicas e bioquímicas nos tecidos radiculares do hospedeiro vegetal. O aumento nos níveis de fósforo pode modificar a composição de fosfolípidios e a permeabilidade de membrana radicular, diminuindo a exsudação de açúcares, ácidos carboxílicos e aminoácidos na rizosfera. Isso pode estar relacionado à possível regulação do efeito quimioestático, diminuindo o movimento dos patógenos em direção a superfície radicular (XAVIER & BOYETCHKO, 2004). As alterações na arquitetura e morfologia radicular por micorrizas ainda não foram relacionadas diretamente com a diminuição da incidência de patógenos radiculares (AZCÓN-AGUILAR et al., 2002; VIERHEILIG et al., 2008), necessitando trabalhos mais aprofundados.

4.4.4. Respostas de defesa a patógenos em plantas micorrizadas

A mais intrigante e curiosa forma de supressão de patógenos radiculares por micorrizas arbusculares é aquela relacionada com alterações bioquímicas e moleculares no hospedeiro vegetal, decorrentes da ativação de respostas de defesa ou indução de resistência.

A exposição de plantas a agentes bióticos não-patogênicos e a fatores abióticos (ácido salicílico, etileno) pode induzir sinais bioquímicos que ativam a expressão de genes relacionados à resistência; dessa forma é desencadeando respostas mais rápidas de defesa que conferem aumento no nível de proteção e restringem o ataque de patógenos, diminuindo os danos causados no hospedeiro vegetal (KUC, 2001). Esse “estado de alerta” pode ocorrer de forma localizada ou sistêmica, dependendo da distância do ponto infectivo do agente indutor. A resistência do tipo sistêmica pode ser classificada em duas categorias, de acordo com os processos bioquímicos envolvidos: Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e Resistência Sistêmica Induzida (ISR). A presença do ácido salicílico como sinal molecular indutor e o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese caracterizam a SAR; a presença de jasmonatos e etileno são os sinais envolvidos na ISR, sem acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (DURRANT & DONG, 2004; STADNIK &

MARASCHIN, 2004). Em relação a expressão fenotípica, os dois fenômenos são idênticos, pois envolvem a expressão de resistência de forma sistêmica (STADNIK & MARASCHIN, 2004), consideradas complementares, com sobreposição parcial e ações específicas frente diferentes tipos de patógenos (VAN LOON et al., 2006). Muitas questões sobre as diferenças entre as categorias de resistência induzida estão em aberto e são motivos de debate (KUC, 2001; VAN LOON et al., 2006). Assim, a resistência induzida pode ser tratada como fenômeno único e ser relacionada, quando necessário, com o seu local de ação (sistêmica ou localizada).

Estudos vêm demonstrando que micorrizas arbusculares podem regular a expressão de genes relacionados à defesa contra patógenos, induzindo formas de resistência até então latentes. Após a inoculação de patógenos, plantas micorrizadas podem responder de forma mais rápida e expressiva que plantas não inoculadas com FMA. Tais respostas podem ser de natureza bioquímica e estrutural, como: produção de compostos fenólicos (ZHU & YAO, 2004; BENHAMOU et al., 1994); formação de barreiras físicas na parede celular com deposição de calose (BENHAMOU et al., 1994; CORDIER et al., 1998); expressão de proteínas relacionadas à defesa contra patógenos, como β -1,3-glucanases, quitinases, fenilalanina amônia-liase, proteases e chalcona sintase (MOHR et al., 1998; POZO et al., 1999; SLEZACK et al., 1999; POZO et al., 2002a).

Trabalhos recentes têm empregado um sistema de divisão do sistema radicular de plantas em compartimentos distintos, o que tem permitido avaliar os tipos de resistência induzidas em plantas micorrizadas a patógenos radiculares. Além da resistência localizada, plantas micorrizadas induzem resistência de forma sistêmica, atestando capacidade de se defender a patógenos (CORDIER et al., 1998; POZO et al., 2002a; ZHU & YAO, 2004) e nematóides (ELSEN et al., 2008) em frações de raízes não micorrizadas. O trabalho pioneiro realizado por Cordier et al. (1998) em tomateiro constatou que a formação de micorrizas induziu resistência contra *Phytophthora parasitica* de forma localizada, caracterizada pela incapacidade do patógeno em invadir as células que contém arbúsculos de fungo micorrízico. Investigações citomoleculares mostraram que a fração de raízes não micorrizada apresentou, em consequência da ativação dos mecanismos de defesa da planta pela fração micorrizada, respostas sistêmicas que impediram a penetração da hifa de *Phytophthora parasitica*, reduzindo o desenvolvimento do patógeno.

O fenômeno de indução de resistência permite que as plantas evitem ou desacelerem o processo infectivo de um patógeno, tornando-as

mais resistentes a um ataque subsequente (STADNIK & MARASCHIN, 2004). Quando expostas a um patógeno, as plantas podem reagir à presença deste com um grupo de respostas integradas e complexas, incluindo reações de hipersensibilidade e queima oxidativa; fortificação da parede celular com deposição de lignina e proteínas estruturais; produção de metabólitos secundários (fitoalexinas, por exemplo); e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese com atividade antimicrobiana (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; LEBEDA et al., 2001).

Proteínas relacionadas à patogênese é um termo utilizado para todas as proteínas cuja produção é induzida por microorganismos, incluindo proteínas presentes e detectáveis nos tecidos vegetais saudáveis, antes do início do processo infectivo. São conhecidas 17 famílias de proteínas relacionadas à patogênese (simbolizadas pelas letras PR), as quais são divididas de acordo com as propriedades bioquímicas e biológicas e numeradas de acordo com a ordem de descoberta (VAN LOON et al., 2006). Quitinases e β -1,3-glucanases, por exemplo, são proteínas relacionadas à patogênese que promovem a clivagem enzimática dos polissacarídeos quitina e glucana, respectivamente (LEBEDA et al., 2001). A primeira, de acordo com a propriedade, pode pertencer às famílias PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11, e a segunda, pertence à família PR-2 (VAN LOON et al., 2006). Além do papel direto na supressão de patógenos, a hidrólise causada por quitinases e β -1,3-glucanases, como já dito anteriormente, libera elicitores da parede celular de fungos patogênicos, que por sua vez podem ativar outros processos bioquímicos de resistência.

Estudos em eletroforese unidimensional utilizando-se substratos enzimáticos para detecção de atividade lítica têm sido realizados no patossistema tomateiro-*Phytophthora parasitica* (DASSI et al., 1998; POZO et al., 1999, 2002a), provendo melhor entendimento sobre a função de micorrizas na expressão de proteínas relacionadas à patogênese. Isoformas básicas de β -1,3-glucanases induzidas por micorrizas tiveram relação com a bioproteção de tomateiros ao patógeno (POZO et al., 1999); essa enzima, em conjunto com quitinases, quitosanase e superóxido dismutase, foram induzidas de forma localizada pela simbiose mutualística (POZO et al., 2002a). Nesse mesmo estudo foi verificada, em plantas micorrizadas, a expressão sistêmica de proteínas com atividade lítica, ou seja, que promoviam a clivagem enzimática de polissacarídeos da parede celular de *P. parasitica*. A produção de metabólitos secundários também está envolvida nas interações entre micorrizas arbusculares e patógenos. Zhu & Yao (2004) constataram que mi-

corrizas em tomateiro induziram a produção de compostos fenólicos solúveis de forma localizada e sistêmica, o que suprimiu a infecção da bactéria *Ralstonia solanacearum*, causadora de murcha vascular no sistema radicular da cultura.

4.4.5. Sinais e eventos regulados por micorrizas em respostas de defesa a patógenos

Foi apresentado anteriormente que o processo de colonização micorrízica elicit respostas de defesa fracas e temporárias durante as fases iniciais de penetração de hifas nos tecidos radiculares, ao passo que tais respostas são fortes e localizadas nas células que recebem os arbúsculos no estabelecimento da funcionalidade da simbiose. Essas respostas não são típicas de infecções patogênicas, pois não ocorrem nos mesmos níveis e distribuição espacial. Em plantas mutantes incapazes de formar micorrizas arbusculares, ocorre o contrário: a presença de estruturas de FMA induz respostas de defesa semelhantes àquelas observada em interações patogênicas. Isso demonstra que a acomodação dos fungos mutualísticos é controlada por genes do hospedeiro vegetal, que suprimem as respostas de defesa para permitir a formação de micorrizas.

A questão é saber como essas respostas são ativadas com rapidez suficiente para que a planta acione estratégias que irão diminuir ou impedir a invasão de tecidos radiculares por patógenos. De acordo com o entendimento atual, esse fato está diretamente relacionado com o efeito de supressão de patógenos em plantas micorrizadas. Uma idéia é de que os compostos de defesa produzidos previamente pela presença de FMA sensibilizam os tecidos radiculares e tornariam mais rápidas as respostas à infecção posterior por patógenos (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1996; AZCÓN-AGUILAR et al., 2002), permitindo supressão mais eficiente que em plantas não micorrizadas.

Indo mais a fundo na questão, Pozo & Azcón-Aguilar (2007) sugerem que a velocidade de respostas decorre do pré-condicionamento dos tecidos radiculares, induzida pela presença de micorrizas funcionais. Esse fenômeno é conhecido como *priming* e possivelmente é a principal forma de resistência induzida por micorrizas arbusculares. A sensibilização do sistema radicular por micorrizas arbusculares explicaria resultados positivos de supressão de ataque de patógenos, sem acúmulo prévio de metabólitos. Em tomates micorrizados com *Glomus mosseae*, Cordier et al. (1998) constataram a indução de respostas de resistência sistêmica na fração do sistema radicular não micorrizado, pelo engrossamento da parede celular com pectinas não-esterificadas e resistência

localizada em células contendo arbúsculos, pela formação de calose nas células próximas a hifa de *Phytophthora parasitica*. Outro exemplo é o trabalho de Mohr et al. (1998), no qual feijoeiros inoculados com esse mesmo fungo micorrízico não alteraram a expressão de quitinases, β -1,3-glucanases e fenilalanina amônia-liase em comparação a plantas não micorrizadas. Entretanto, um dia após a inoculação de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* já se constatou aumento considerável na atividade dessas enzimas nas plantas micorrizadas.

O “estado de alerta” ou “estado sensibilizado” faz parte do fenômeno de resistência sistêmica induzida, que pode se somar às barreiras estruturais e bioquímicas, variáveis de acordo com o genótipo vegetal. Essa condição fisiológica permite a planta desenvolver respostas de defesa de forma mais rápida e expressiva frente a estresses abióticos e bióticos e é uma característica comum de respostas de resistência induzidas por microorganismos. Os estudos ainda têm foco restrito, principalmente com rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, como *Pseudomonas* e *Bacillus* (CONRATH et al., 2006).

Trabalhos indicam que o sinal molecular responsável por esse “estado de alerta” é o ácido jasmônico. Em plantas de cevada micorrizada por *Glomus intraradices*, Hause et al. (2002) constataram aumento nos níveis de ácido jasmônico e na expressão de genes codificando enzima da biossíntese desse hormônio. Os autores concluíram que ácido jasmônico é gerado e atua especificamente dentro de células contendo arbúsculos e está relacionado com o estabelecimento funcional da simbiose. Eles especularam que os níveis mais elevados do hormônio em plantas micorrizadas têm relação com a resistência de tecidos radiculares a patógenos.

Pozo & Azcón-Aguilar (2007) sugerem que formação de micorrizas, pelo aumento nos níveis de ácido jasmônico, pré-condiciona os tecidos radiculares a responder de forma rápida e eficiente à presença de patógenos. Essas respostas induzidas pela simbiose diferenciam-se da resistência basal de plantas não micorrizadas, no qual a produção dos sinais de alerta é dependente do reconhecimento do patógeno. Nesse caso, além de ácido jasmônico, há produção de ácido salicílico e etileno, metabólitos que também regulam rotas de transdução de sinais e modulam as respostas de defesa (POZO et al., 2005; POZO & AZCÓN-AGUILAR, 2007), como mostra a Figura 2 para os estudos utilizando *F. oxysporum* como modelo de patógeno.

Pozo et al. (2009) propõem que micorrizas funcionais suprimem parcialmente as respostas de defesa reguladas pelo ácido salicílico, para assim permitir a interação compatível entre os tecidos radiculares e um

fungo de natureza biotrófica. De fato, as respostas de defesa dependentes de ácido salicílico constituem estratégias de defesa relacionadas a interações patogênicas entre plantas e fungos biotróficos, como *Puccinia* (CRAMPTON et al., 2009) e *Oidium* (ACHUO et al., 2004): a reação de hipersensibilidade envolve a produção de espécies reativas a oxigênio que culminam na necrose de tecidos, impedindo assim o avanço de patógenos que necessitam de tecidos vivos para desenvolvimento (PIETERSE & VAN LOON, 2007).

Pozo et al. (2009) sugerem que plantas micorrizadas, como forma de compensação, utilizam rotas de sinalização de defesa reguladas pelo ácido jasmônico. Esse sinal molecular, diferente do ácido salicílico, está envolvido em respostas de defesa a patógeno necrotróficos, ou seja, que se desenvolvem a partir de células e tecidos vegetais mortos (KLIEBENSTEIN & ROWE, 2008). Segundo Pozo et al. (2009), isso explicaria porque plantas micorrizadas são mais resistentes a microorganismos necrotróficos (*Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*) e mais suscetíveis a patógenos biotróficos. Nesse caso, a suscetibilidade pode se refletir na parte aérea das plantas, como mostraram Gernns et al. (2001) em cevada: a formação de micorrizas aumentou a colonização e esporulação do fungo *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, causador do míldio, em comparação a plantas não micorrizadas.

São necessários maiores estudos para esclarecer o papel de cada componente das respostas de defesa de plantas micorrizadas e as rotas de sinalização que regulam essas respostas sob ataque de patógenos (VIERHEILIG et al., 2008), especialmente confirmar a função de sinal endógeno do ácido jasmônico na indução de resistência de plantas micorrizadas (VAN WEES et al., 2008). Conrath et al. (2002) sugerem que o *priming* promove o acúmulo de moléculas responsáveis pela sinalização de respostas de defesa, inclusive fatores de transcrição, que levariam às respostas mais rápidas quando as células sofrem algum tipo de estresse. Os autores afirmam que muitas questões sobre a base molecular desse fenômeno são suposições e precisam ainda ser esclarecidas. Outra vantagem para o hospedeiro, além de poder se defender mais rapidamente de inimigos, é o custo energético baixo do pré-condicionamento, comparado à ativação ou acúmulo de formas constitutivas de defesa pela planta (POZO & AZCÓN-AGUILAR, 2007), uma vez que o *priming* não induz diretamente a expressão de genes de defesa. Segundo esses autores, isso ajuda a explicar o fato das micorrizas terem se conservado evolutivamente tanto tempo e abranger tantas espécies vegetais.

A revisão recente de Vierheilig et al. (2008) apresenta uma perspectiva interessante sobre a relação entre a regulação da simbiose pela

planta hospedeira e a bioproteção de micorrizas contra patógenos. Trabalhos com a divisão do sistema radicular de plantas em duas metades isoladas mostraram que a simbiose estabelecida de um lado suprimiu a colonização por FMA inoculado posteriormente do outro lado. De acordo com os autores, a restrição à colonização micorrízica visa controlar os gastos energéticos com a manutenção das estruturas dos FMA, de maneira que a planta é capaz de promover a “auto-regulação da micorrização”.

São poucos os trabalhos nesse âmbito de estudo, de modo que são desconhecidos os mecanismos que controlam a auto-regulação. Esse fenômeno e a bioproteção conferida por micorrizas são, nas palavras de Vierheilig et al. (2008), “dois lados da mesma moeda”: as reações que impedem a colonização micorrízica além do limite regulado pela planta e o estabelecimento de simbioses parasíticas são as mesmas. Por esse motivo é necessário um nível mínimo de colonização micorrízica para que se constate efeito supressivo a patógenos (CORDIER et al., 1998; KHAOSAAD et al., 2007); o fenômeno de auto-regulação ocorre de forma análoga, de maneira que a supressão da colonização micorrízica surge quando se atinge o nível máximo ideal para a planta (VIERHEILIG et al., 2008). A abordagem de Vierheilig et al. (2008) parece ser uma perspectiva diferenciada de tratar a questão do *priming* em plantas micorrizadas. O fato de plantas micorrizadas reconhecerem a presença de FMA como se fossem patógenos parece ir de encontro ao efeito *priming* no hospedeiro vegetal. Em estudos futuros, a conciliação dos conhecimentos permitirá compreensão melhor dos eventos de sinalização celular e expressão de genes relacionados à resistência contra patógenos. Dessa forma será possível entender como micorrizas arbusculares regulam as respostas de defesa e o fenômeno de supressão de patógenos.

5. Proteômica

5.1. O advento da proteômica

O sequenciamento completo de genomas abriu as portas para um novo universo de estudos dentro da biologia. A Ciência vive a era das ‘ômicas’. Cada componente do dogma central da biologia passou a ter uma área de estudo própria, de abordagem em larga escala e associada à genômica (Figura 5). A integração das ‘ômicas’, de acordo com Patterson & Aebersold (2003), servirá de subsídio para o desenvolvimento da biologia de sistemas, termo que os autores denominam de “estudo de um sistema biológico pela análise sistemática e quantitativa de todos os

componentes que constituem o sistema”. Do conhecimento das potencialidades contidas nos genes, se vislumbra desvendar padrões de funcionalidade.

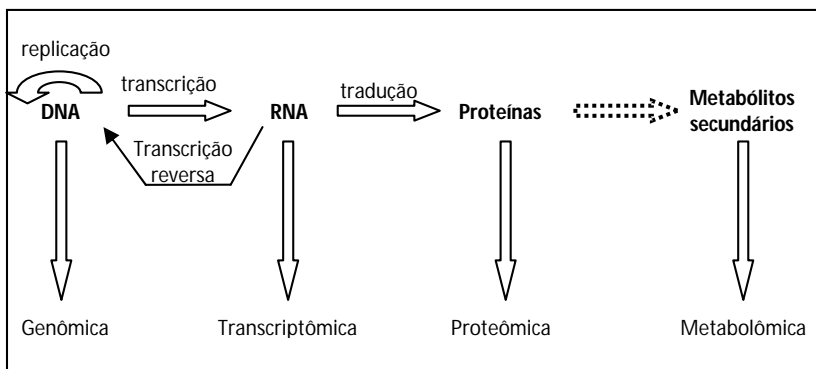


Figura 5. Dogma central da biologia e áreas de estudos correlatas aos níveis do fluxo de informação genética (adaptado de RÉDEI, 2008).

Os termos proteoma - ‘the protein complement of the genome’ - e proteômica - o processo de estudo do proteoma - foram cunhados em 1994 no 1º Encontro de Eletroforese Bidimensional em Siena, Itália, e publicados por Wilkins e colaboradores no periódico *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* em 1995 (PATTERSON & AEBERSOLD, 2003). Em outras palavras, proteômica pode ser definida como sendo a análise de proteínas em grande escala (BESTEL-CORRE et al., 2004). Proteoma e proteômica como objeto e meio de estudo, respectivamente, foram vinculados conceitualmente a genoma e genômica, representando o encadeamento e associação entre DNA e proteínas, genes e produtos da expressão de genes.

Admite-se que o proteoma inclui todas as proteínas resultantes da expressão de genes em uma célula, organela, tecido ou organismo e por meio de proteômica busca-se identificar e caracterizar padrão de expressão, localização celular, atividade, regulação, modificações pós-traducionais, interações moleculares e funções de cada proteína em um sistema biológico (FINNIE, 2006). Dessa forma, a análise sistemática de proteomas poderá proporcionar entendimento mais direto das funções e da regulação dos processos metabólicos que a análise de genes (BERTONE & SNYDER, 2005).

O surgimento da proteômica, como disciplina organizada, é atribuído ao desenvolvimento da eletroforese bidimensional em 1975 por

Patrick O'Farrel (BRADSHAW, 2008), que previu as atuais possibilidades de uso da técnica: “devido à resolução e sensibilidade, essa técnica é uma ferramenta poderosa para análise e detecção de proteínas em recursos biológicos complexos” (O'FARREL, 1975). O que faz esse campo de estudo parecer recente é o fato de que o progresso nas pesquisas ocorreu a partir do completo sequenciamento do genoma humano em 2001, somado à aplicação das tecnologias de espectrometria de massa com ionização *electrospray* (*electrospray ionization* - ESI) e baseada em Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser (*matrix-assisted laser desorption ionization* - MALDI). Os espectrômetros de massa melhoraram a sensibilidade de identificação de proteínas separadas por géis e a elucidação de modificações pós-traducionais em proteínas (PATTERSON & AEBERSOLD, 2003; BRADSHAW, 2008).

Os avanços tecnológicos na análise de proteínas permitiram uma evolução rápida da química de proteínas, baseada no estudo individual de estrutura e função de proteínas, para a proteômica, com uma abordagem mais complexa, em larga escala (BRADSHAW, 2008) e complementar a análise da expressão de genoma (ROSSIGNOL, 2001). Além da associação com informações geradas pela genômica, a complementaridade entre técnicas de proteômicas e transcriptômicas poderá indicar, por exemplo, se a regulação de um determinado processo fisiológico estudado está sendo feito ao nível de transcrição ou tradução (CÁNOVAS et al., 2004).

5.2. Um paralelo entre proteômica e genômica

Diferente de um genoma, que pode ser definido sequencialmente, a descrição do proteoma de um determinado ser vivo parece ser uma tarefa impossível: seria necessário, por exemplo, determinar a expressão de todas as proteínas em função do tempo e condições fisiológicas do ser vivo. Para alcançar a totalidade do proteoma, os trabalhos de proteômicas têm outras tarefas árduas, como determinação das estruturas e funções de proteínas geradas pelo genoma de um organismo, incluindo modificações pós-traducionais, determinação de todas as interações possíveis das proteínas e a organização das informações obtidas, por meio da bioinformática, para descrição do organismo em questão (BRADSHAW, 2008).

Assim, a complexidade experimental de proteômica é muito maior se comparada a genômica. Embora possa ser complexa do ponto de vista técnico, o sequenciamento de genomas tem um fim determinado e conclusivo - definir a sequência completa de genes de um ser vivo

(PATTERSON & AEBERSOLD, 2003). O proteoma, por sua vez, é dinâmico e os resultados obtidos são somente um instantâneo da expressão de genes de um organismo estudado (HEAZLEWOOD & MILLAR, 2006). Como é o caso do genoma humano, um número relativamente baixo de genes é capaz de gerar um proteoma de grande, e ainda pouca conhecida, complexidade (PATTERSON & AEBERSOLD, 2003). Por fim, proteínas têm maior diversidade de propriedades que ácidos nucleicos, não há PCR para proteínas e assim a quantidade inicial de tecidos e a sensibilidade de detecção são limitações críticas e a concentração de proteínas pode variar bastante entre tecidos ou órgãos (PECK, 2005).

5.3. Eletroforese e espectrometria de massa

Um dos principais métodos usados na análise de proteínas é a separação por eletroforese bidimensional seguido pela identificação por espectrometria de massa. Por eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida, é possível separar, mapear e quantificar polipeptídeos de proteínas desnaturadas. Na primeira dimensão da eletroforese, os peptídeos são separados de acordo com gradientes de pH e na segunda dimensão, pela massa molecular (BESTEL-CORRE et al., 2004). As principais limitações de eletroforese bidimensional é a resolução baixa de proteínas básicas ($pI > 9$), grandes ($MM > 100$ kDa) ou hidrofóbicas. Mesmo assim, está entre os melhores métodos, ou pode ser considerada a melhor opção, de avaliar formas de proteínas em amostras (PECK, 2005; FINNIE, 2006).

Terminada a eletroforese, os géis são digitalizados em imagens, que são importadas a programa de computador que permite detectar e juntar as concentrações de proteínas visíveis nos géis, denominadas de bandas, e identificar diferenças quali e quantitativas entre as populações de proteínas. As bandas são retiradas dos géis e submetidas à digestão com proteases, geralmente tripsina, para gerar fragmentos de peptídeos (HURKMAN & TANAKA, 2007). Os fragmentos são analisados em espectrômetros de massa, aparelhos que medem a relação massa/carga de peptídeos ou proteínas e fornecem informações sobre os íons moleculares componentes dessas moléculas, que por sua vez permitem definir a sequência provável de aminoácidos (PATTERSON & AEBERSOLD, 2003; BERGMÜLLER et al., 2006). A relação entre as proteínas e os genes correspondentes pode ser feito a partir da sequência completa do genoma do organismo em questão (PATTERSON & AEBERSOLD, 2003).

5.4. Proteômica em estudos com plantas

Técnicas de proteômica têm ampla aplicabilidade na biologia. Em medicina, estudos de proteomas, associados aos conhecimentos produzidos ao nível de genoma, são utilizados na busca de biomarcadores de doenças, como o câncer (BRADSHAW, 2008). O sequenciamento completo dos genomas de *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* serviram de subsídio para o progresso da proteômica vegetal, que utilizou essas espécies como modelos principais de estudo (CÁNOVAS et al., 2004; RAMPITSCH & SRINIVASAN, 2006; FINNIE, 2006). A partir do genoma dessas duas plantas foi possível fazer a identificação automatizada de proteínas, a partir de homologia das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, e categorizar todas as proteínas presentes nas amostras. A identificação e categorização de todas as proteínas presentes nas amostras analisadas forneceram o “proteoma total” das espécies (RAMPITSCH & SRINIVASAN, 2006).

Assim, estudos de proteomas de plantas trilharam o mesmo caminho da aplicação da proteômica em outras áreas da biologia, ou seja, para identificação, de forma rápida, de todas as proteínas expressas por uma célula ou tecido. Nesse sentido, a proteômica serviu como um meio de identificar genes e para um propósito descritivo (ROSSIGNOL, 2001). Seguindo outra linha, proteômica vegetal tem sido aplicada com o propósito de avaliar respostas biológicas frente, por exemplo, a estresses de origem abiótica e biótica (ROSSIGNOL, 2001; PECK, 2005).

Rampitsch & Srinivasan (2006) lançam uma crítica às iniciativas de caracterização do proteoma total de plantas. Embora uma planta permaneça com o genoma praticamente estável durante o desenvolvimento e passível de ser seqüenciado, a caracterização completa do proteoma é “ilusão”, pois a programação genética é dinâmica e a expressão de genes é regulada por muitos fatores, como as características do material biológico avaliado, o estágio de desenvolvimento das plantas e a existência de estímulos externos. Pode-se dizer que a caracterização das proteínas expressas em um determinado momento registra o ‘proteoma instantâneo’.

A análise do proteoma de plantas pode ser aplicada nos seguintes níveis (FINNIE, 2006):

- catalogar a totalidade e abundância de proteínas sintetizadas em um organismo, tecido ou organela;
- caracterizar mudanças durante etapas fisiológicas do desenvolvimento vegetal;
- identificar proteínas que diferem entre amostras biológicas, expostas a

diferentes agentes bióticos ou abióticos;

- identificar proteínas com base em uma propriedade funcional, pela análise comparativa do proteoma de tecidos ou organelas.

Dessa forma, trabalhos com proteômica atingem um grande campo de ação, envolvendo desde a análise de uma única proteína isolada até análises múltiplas em larga escala de centenas ou milhares de proteínas de um organismo vivo (HEAZLEWOOD & MILLAR, 2006).

Os números de proteínas identificadas em estudos com *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* têm sido bem menores que o número máximo que teoricamente as plantas podem expressar (RAMPITSCH & SRINIVASAN, 2006). Esse fato tem sido relacionado a problemas intrínsecos ao material, como baixas concentrações de proteínas, e às limitações da eletroforese bidimensional. A natureza dos tecidos vegetais, com parede celular rígida e uma variedade de metabólitos secundários capaz de interferir nas análises, indica que desafios extras são envolvidos no estudo de proteomas vegetais, comparado a outros organismos (FINNIE, 2006). As dificuldades são maiores em plantas lenhosas, nas quais tanto o isolamento de ácidos nucleicos e a preparação de amostras de proteínas são problemas relevantes, uma vez que substâncias interferentes comuns em plantas (polissacarídeos, pigmentos e fenóis) são abundantes (CÁNOVAS et al., 2004). A complexidade de compreensão do proteoma vegetal tem levado os pesquisadores a estudar primeiro o proteoma da mitocôndria e do cloroplasto, organelas de metabolismo relativamente mais simples (RAMPITSCH & SRINIVASAN, 2006).

Outro desafio, segundo Finnie (2006), é compreender as funções de proteínas, que muitas vezes são identificadas, mas não tem nenhuma semelhança a proteínas de função conhecida. O mesmo se aplica ao campo da genômica, pois segundo esse autor, as funções de aproximadamente um terço dos genes de *Arabidopsis thaliana* são desconhecidas, sugerindo que há muito a desvendar sobre a biologia vegetal.

5.5. Proteômica em interações entre plantas-microorganismos

O estudo de proteomas em respostas de defesa a patógenos é um campo ainda pouco explorado. A proteômica pode ser aplicada para elucidar os processos moleculares que ocorrem no reconhecimento de patógenos pelas plantas, durante o processo infectivo e nas respostas de defesa da planta (KAV et al., 2007; KIM & KANG, 2008). A comparação de perfis proteômicos permite observar indução na expressão de genes pela presença de patógenos, auxiliando na identificação de grupos de

proteínas específicas envolvidos na resistência de plantas aos patógenos (COLDITZ et al., 2007; KIM & KANG, 2008). Associado aos conhecimentos produzidos pela genômica, especialmente o sequenciamento de genomas de patógenos e de plantas, será possível a caracterização de proteínas e genes Avr e elicitores, por exemplo (COLDITZ et al., 2007). Tais resultados também poderão ser relacionados com a suscetibilidade ou resistência de plantas.

Trabalho recente com ervilha (AMEY et al., 2008) comparou perfis protéicos obtidos por eletroforese bidimensional de plantas inoculadas e não inoculadas com *Peronospora viciae*. Várias proteínas foram alteradas em sua abundância e 12 aumentaram nas folhas inoculadas, das quais oito foram seqüenciadas. Nenhuma proteína diminuiu em abundância após a infecção e a proteína PI136, por exemplo, foi identificada como sendo uma proteína relacionada à patogênese (AMEY et al., 2008). Em raízes de *Medicago truncatula*, o patógeno *Aphanomyces euteiches* induziu principalmente proteínas relacionadas à patogênese pertencentes à família 10 (PR-10), do tipo ribonucleases, de função desconhecida (COLDITZ et al., 2004).

As avaliações de modificações pós-traducionais, como fosforilação ou glicosilação, são informações úteis em estudos de proteomas de interações patogênicas, ainda mais que tais modificações não são identificadas no transcriptoma. A fosforilação de proteínas é a modificação pós-tradução predominante em respostas a patógenos (THURSTON et al., 2005), regulando processos de respostas de defesa estimulados por elicitores e atuando provavelmente nas rotas de sinalização após percepção de microorganismos. A identificação de proteínas quinases e fosfatases e respectivos substratos são informações importantes para esclarecer os primeiros passos das interações plantas-microorganismos (COLDITZ et al., 2007). Outra possibilidade é a análise de proteomas de membranas plasmáticas, que permitem identificar proteínas envolvidas na identificação de elicitores e nos primeiros passos de sinalização intercelular (THURSTON et al., 2005). Enfim, a identificação de proteínas e o conhecimento das respectivas funções em interações entre plantas e patógenos podem ser usados em programas de seleção e melhoramento de plantas e desenvolvimento de novas linhagens com maior resistência.

Os estudos com proteômica em associações micorrízicas e nódulos fixadores de nitrogênio foram iniciados na década de 90, auxiliando no entendimento da complexidade envolvida na interação entre genomas distintos (BESTEL-CORRE et al., 2004). Nesses tipos de trabalhos, a comparação do sistema radicular de plantas formando simbiose e raízes de plantas testemunhas permitem avaliar proteínas que são induzidas ou

suprimidas pelas associações micorrízicas ou pelos nódulos fixadores de nitrogênio e, em consequência, o nível de interação entre os metabolismos dos simbiontes. Estudos de proteomas em micorrizas arbusculares têm sido feito a partir da base de dados de seqüências de *Medicago truncatula*, espécie leguminosa capaz de formar associações com rizóbios e FMA, uma vez que *Arabidopsis* spp. não forma nenhuma dessas interações mutualísticas (DUMAS-GAUDOT & RECORBET, 2007).

A detecção e a identificação de proteínas relacionadas à simbiose têm sido feitas pelo uso de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, respectivamente, mas poucas proteínas foram identificadas em relação às bandas detectadas nos géis de eletroforese. Pelo fato de os estudos serem relativamente recentes, existem muitas questões a serem exploradas sobre proteomas em simbioses mutualísticas, e o entendimento da dinâmica de expressão de genes depende também de modificações em protocolos, refinamento e evolução das técnicas e desenvolvimento de novos procedimentos em proteômicas (BESTEL-CORRE et al., 2004; DUMAS-GAUDOT & RECORBET, 2007). Além disso, a identificação das proteínas com espectrometria de massa depende de seqüências de genomas de simbiontes vegetais e fúngicos, notadamente *Medicago truncatula* e *Glomus intraradices*, principais espécies utilizadas nos trabalhos sobre proteoma de micorrizas (DUMAS-GAUDOT & RECORBET, 2007).

Embora haja limitações, trabalhos como o de Natera et al. (2000) conseguiram caracterizar e identificar produtos da expressão de genes presentes em nódulos fixadores de nitrogênio formados entre a bactéria *Sinorhizobium meliloti* e *Melilotus alba* e nos simbiontes isolados. Foram induzidas mais de 250 proteínas nos nódulos, comparados às raízes de plantas testemunhas, e mais de 350 proteínas foram suprimidas por *Sinorhizobium meliloti* nos nódulos, em comparação a células bacterianas cultivadas isoladamente. Proteínas envolvidas na absorção e metabolismo de uréia e de outros compostos nitrogenados similares não foram expressadas pelo rizóbio no nódulo, confirmando que *Sinorhizobium meliloti*, com a formação da simbiose, passou de assimilador a exportador de amônio.

O trabalho de Bestel-Corre et al. (2002) foi o pioneiro na identificação de proteínas induzidas pela formação de micorrizas arbusculares. Analisando o proteoma de raízes de *Medicago truncatula* inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e *Glomus mosseae*, os autores identificaram o aumento na expressão de 12 polipeptídios, diminuição em dois polipeptídios e 41 que foram induzidos em resposta a micorrização. Em resposta à nodulação, quatro proteínas aumentaram a expressão, um a

diminuiu e 46 foram induzidos. Nenhuma proteína foi induzida para ambas as simbioses (BESTEL-CORRE et al., 2002), embora como mostrado anteriormente, existem genes em comum que regulam os processos de micorrização e nodulação.

Uso de espectrometria de massa e comparação dos resultados com bases de dados de massa de peptídeos e sequência de aminoácidos permitiram identificar homologias, por exemplo, de proteínas induzidas pela micorrização que estão envolvidas em respostas de defesa: peroxidase, enzima induzida frente a ataque por patógenos; e proteína inibidora de poligalacturonase, produzida para evitar a ação de poligalacturonases, enzimas de fungos patogênicos que degradam a parede celular das células vegetais (BESTEL-CORRE et al., 2002). Micorrizas também induziram proteínas envolvidas na fisiologia radicular e cadeia respiratória. A nodulação com rizóbio induziu proteínas relacionadas à fixação do nitrogênio, com homologia de peptídeos à leghemoglobina e nitrogenase, por exemplo, e proteínas envolvidas no metabolismo do carbono, como a enolase, que catalisa a interconversão de fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante a glicólise (BESTEL-CORRE et al., 2002). Os autores concluem que técnicas de proteômica – eletroforese bidimensional e espectrometria de massa – podem ser usadas para a identificação de proteínas induzidas e reguladas no desenvolvimento e funcionamento de simbioses, auxiliando no entendimento de eventos que ocorrem a nível celular.

Os estudos com proteômica em micorrizas arbusculares se concentram na observação de contrastes nos perfis dos proteomas entre plantas micorrizadas e não micorrizadas e a identificação de proteínas geradas em três momentos distintos do estabelecimento da associação: na fase pré-infecção, pela análise de esporos e micélios de FMA; nos primeiros estágios, pelo desenvolvimento do apressório do fungo na superfície radicular; e no estágio final, quando a micorriza é funcional (DUMAS-GAUDOT & RECORBET, 2007). O primeiro trabalho que identificou proteínas de uma espécie de fungo micorrízico por meio de proteômica é bastante recente. Micélio e esporos extrarradiculares de *Glomus intraradices* produziram 438 bandas em gel de eletroforese bidimensional. Em culturas *in vitro* de raízes transformadas de cenoura, micorrizas induziram quatro proteínas, das quais duas apresentaram sequências homólogas à proteína Myk15, previamente descrita e de função ainda desconhecida (DUMAS-GAUDOT et al., 2004a).

A primeira publicação identificando proteínas de fungo micorrízico em plantas micorrizadas, por meio de análise do proteoma de raízes veio logo depois. Valot et al. (2005) monitoraram a expressão de proteí-

nas associadas à membrana plasmática em raízes micorrizadas de *Medicago truncatula*. *Glomus intraradices* induziu 15 proteínas, aumentou os níveis de expressão de três proteínas e diminuiu tais níveis de 18 proteínas. Os autores concluíram que as proteínas induzidas correspondem a proteínas de *G. intraradices* expressas na planta ou proteínas de *M. truncatula* expressas em respostas a formação de micorriza arbuscular. De fato, três proteínas apresentaram homologia a proteínas de origem fúngica já identificadas: subunidades α e β de ATP sintase mitocondrial das leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, e a subunidade β de ATP sintase de hifa extrarradicular do próprio *G. intraradices*, identificada previamente no estudo de Dumas-Gaudot et al. (2004). É interessante destacar nesse trabalho o aumento na expressão de proteína do tipo nodulina, induzidas durante a formação e estabelecimento de nódulos por rizóbios, mais uma prova da sobreposição de rotas de expressão de genes entre as duas simbioses mutualísticas (VALOT et al., 2005).

Embora a aplicação de proteômica em estudos com micorrizas arbusculares seja bastante recente, é possível se prever que investigações futuras podem ir além da regulação de proteínas expressas no estabelecimento da simbiose. Conhecimentos básicos sobre o proteoma da simbiose micorrízica acenam para uso de técnicas de proteômica – eletroforese bidimensional, espectrometria de massa – no avanço dos conhecimentos sobre o papel da simbiose frente a estresses ambientais e a respostas a infecção por organismos patogênicos. Estudos com eletroforese bidimensional e espectrometria de massa têm permitido identificar proteínas relacionadas a diminuição de estresse abiótico, como toxicidade por cádmio (ALLOUI et al., 2009). O mesmo poderá ser feito para entender interações entre genótipos vegetais, fungos micorrízicos e patógenos radiculares.

6. Síntese

Os benefícios de micorrizas arbusculares, do ponto de vista prático e de aplicabilidade dos conhecimentos gerados pelas pesquisas, têm duas frentes de uso: na forma de inoculantes de isolados de FMA selecionados para determinado fim e pelo manejo do solo e das espécies vegetais cultivadas nos sistemas agrícolas. Um exemplo de aplicação no primeiro caso é a utilização na produção de mudas, especialmente plantas micropropagadas *in vitro*, saindo de condições heterotróficas e necessitando superar o estresse de adaptação às condições *ex vitro*. Avalia-

ções de isolados de FMA em condições controladas fazem parte da quase totalidade das pesquisas sobre os benefícios de micorrizas arbusculares. Os resultados dessas investigações se aproximam mais da realidade do uso de FMA como biotecnologia, na forma de inoculantes. Em relação à supressão de patógenos por micorrizas arbusculares, a geração de informações a partir de condições controladas pode ser subsídio para pesquisas futuras a campo, em condições abertas. Isso permitirá avaliar o potencial de uso e manejo de micorrizas arbusculares na agricultura, procurando obter o máximo possível dos benefícios dessa biotecnologia.

A aplicação de técnicas de biologia molecular em sistemas planta - fungo micorrízico - fungo patogênico auxilia na compreensão do papel de micorrizas arbusculares nos eventos de estabelecimento/supressão de doenças radiculares. Assim, essas técnicas permitem avaliar genótipos vegetais com graus diferenciados de suscetibilidade a um patógeno, gerando informações para programas de seleção e melhoramento de cultivares. Aliado a inoculação de fungos micorrízicos, é possível analisar efeitos supressivos de micorrizas arbusculares a patógenos do solo, o que pode confirmar essa biotecnologia como forma de diminuir a restrição de uso de genótipos vegetais.

Em nosso estado, a presença generalizada de *Fusarium* spp. nos solos das principais regiões produtoras de uva tem limitado o uso de porta-enxertos de videira, em detrimento de variedades suscetíveis mas de características agrônômicas desejáveis. Nesses recursos genéticos, é interessante avaliar, em condições controladas, o efeito da inoculação de FMA na severidade de *Fusarium* spp. A comprovação da importância de micorrizas arbusculares na supressão desse patógeno pode ajudar, no futuro, a agregar o uso de inoculantes micorrízicos na produção de mudas e o desenvolvimento de formas de manejo na agricultura que consideram essa simbiose mutualística.

OBJETIVOS E HIPÓTESE

Objetivo geral:

Avaliar o papel da formação de micorriza na expressão de proteínas radiculares em porta-enxerto de videira e na indução de resistência localizada contra *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis*.

Objetivos específicos:

1. monitorar e determinar os níveis de atividade de quitinases e β -1,3-glucanases em raízes de videira inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* na presença ou ausência de micorrizas;
2. comparar perfis de expressão de proteínas radiculares em mudas de porta-enxerto de videira inoculados com o fungo micorrízico *Glomus intraradices* e/ou com o fungo patogênico *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis*;
3. avaliar a ocorrência de supressão do processo de infecção pelo patógeno em mudas micorrizadas de porta-enxerto de videira.

Hipótese:

Micorrizas arbusculares regulam e induzem a expressão de genes na resistência contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* em porta-enxerto de videira suscetível ao patógeno.

EXPERIMENTO 1. Monitoramento da atividade de quitinases e β -1,3-glucanases em raízes de videiras inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*

1. Material e Métodos

1.1. Recursos biológicos

1.1.1. Porta-enxertos de videira

Os porta-enxertos R110 (*Vitis berlandieri* x *V. rupestris*) e SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*), que apresentam resistência e suscetibilidade a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, respectivamente (ANDRADE et al., 1993; GRIGOLETTI JR., 1993), foram micropropagados *in vitro*. As plantas matrizes foram provenientes do programa de melhoramento de videira da Universidade de Davis, Califórnia (EUA), e do Instituto Agrário San Michele de all'Adige (Província Autônoma de Trento – Itália) e foram introduzidas *in vitro*, a partir de culturas de meristemas, pelo Laboratório de Morfogênese Vegetal do Departamento de Fitotecnia, CCA - UFSC.

Explantos dos porta-enxertos de videira foram micropropagados mediante a transferência de segmentos nodais com duas gemas em vidros contendo 30 mL de meio de cultura DSD1 (LIMA DA SILVA & DOAZAN, 1995) acrescido de sacarose (20,0g L⁻¹) e ágar-ágar (6 g L⁻¹). Após 45 a 60 dias de cultivo em sala de cultura (temperatura de 25 \pm 1°C, 16 h luz dia⁻¹, luminosidade incidente de 40 a 45 μ mol m⁻² s⁻¹ ao nível do frasco), de acordo com o vigor de crescimento de cada porta-enxerto, as mudas de videira foram aclimatizadas ao ambiente *ex vitro*.

A aclimatização de porta-enxertos de videira micropropagados foi realizada em bandejas alveoladas de poliestireno expandido contendo substrato particulado esterilizado a 121° C por 40 minutos, a base de composto orgânico termofílico, NITOSSOLO VERMELHO Distroférrico e areia (1:2:2, v/v/v). Os componentes do substrato formulado foram peneirados em malha de 4,76 mm para retirada de material grosseiro; areia passou por peneiragem em malha de 1,19 mm – descartando-se a fração inferior – e em seguida foi lavada.

As raízes das videiras foram podadas a 1,0 cm e a parte aérea foi mantida com 2 a 3 folhas basais antes da transferência. Cada bandeja alveolada foi acondicionada dentro de bandejas plásticas, sobre a qual foi colocada uma lâmina de vidro para permitir a manutenção de condi-

ções saturadas de umidade relativa do ar. As plantas permaneceram em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 h de radiação fotossinteticamente ativa ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e após 15 dias, de acordo com a emissão de folhas novas, foi realizada a retirada progressiva da lâmina de vidro.

Em torno de 30 dias após a saída das condições *in vitro*, as mudas estavam aclimatizadas ao ambiente *ex vitro*; em seguida, as plantas foram transferidas a vasos de 400 mL, contendo o mesmo substrato utilizado na aclimatização, e mantidas em crescimento por 30 dias até os procedimentos experimentais seguintes.

1.1.2. Inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*

Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* foram fornecidos em meio de cultura pela EMBRAPA Uva e Vinho de Bento Gonçalves/RS. Fragmentos do meio de cultura contendo as estruturas do fungo foram transferidos a tubos dos tipos eppendorf e falcon contendo mistura estéril de solo/fertilizante cama de aviário/areia (1:1:1, v/v/v), conforme procedimento descrito por Grigoletti Jr. (1985). Os tubos permaneceram por 3 semanas em câmara de crescimento (25°C , 12 h luz dia^{-1}) para crescimento do fungo e em seguida foram transferidos a 4°C para conservação até o momento de uso.

Para produção de inóculo do patógeno, fração da mistura solo/fertilizante cama de aviário/areia contendo micélio e conídios de *Fusarium* spp. foi ressuspendida em água estéril e 0,2 mL de suspensão foi distribuído, com auxílio de alça de Gridalski, na superfície de placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Após seis dias de cultivo em câmara de crescimento (temperatura $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$, intensidade luminosa de $150 \mu\text{mol m}^{-2}$, fotoperíodo de 16 h luz dia^{-1}), foi realizada a adição de 15 mL de água em cada placa e a raspagem superficial do micélio de *Fusarium* spp. A suspensão obtida, ajustada para a concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios mL^{-1} com auxílio de câmara de Neubauer, forneceu o inóculo do patógeno.

A patogenicidade dos isolados provenientes da EMBRAPA foi testada mediante inoculação de mudas micropropagadas da cultivar de videira SO4. As raízes de plantas, livre de substrato e lavadas em água corrente, foram podadas a 10 cm do colo e imersas em suspensão de conídios por 5 minutos. As plantas retornaram aos vasos nos quais permaneceram por aproximadamente 45 dias, até surgimento de sintomas externos da doença. O caule e as raízes das plantas foram desinfestadas em etanol 70% por 30 segundos e NaOCl 0,5% de Cl ativo por 1 minuto

seguido de lavagens sucessivas em água estéril. Em seguida, fragmentos de caule e raízes foram transferidos a placas de Petri contendo 10 mL de meio de cultura Nash-Snyder modificado (Peptona 15 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1,0 g L⁻¹, MgSO₄ 7 H₂O 0,5 g L⁻¹, ágar 20 g L⁻¹, Pentacloronitrobenzeno 1,0 g L⁻¹; pH 5,5-6,5; sulfato de estreptomicina 1,0 g L⁻¹ após autoclavagem por 20 min a 121° C) (NELSON et al., 1983).

Após 72 h de crescimento em câmara de crescimento, colônias formadas foram avaliadas sob microscópio óptico, selecionando-se aquelas que apresentaram estruturas típicas de *Fusarium*. A comprovação para *F. oxysporum* foi realizada mediante microcultivo de fragmentos de colônias em lâminas de microscópio contendo meio de cultura SNA – Spezieller Nährstoffarmer Agar – (KH₂PO₄ 1,0 g L⁻¹, KNO₃ 1,0 g L⁻¹, MgSO₄ 7 H₂O 0,5 g L⁻¹, KCl 0,5 g L⁻¹, glicose 0,2 g L⁻¹, sacarose 0,2 g L⁻¹, ágar 20 g L⁻¹; pH 5,5-6,5) (LESLIE & SUMMEREL, 2006) e utilização de chaves descritivas para a espécie (NELSON et al., 1983; LESLIE & SUMMEREL, 2006).

1.2. Atividade de quitinases e β -1,3-glucanases

As atividades das enzimas β -1,3-glucanases e quitinases das raízes foram monitoradas entre zero e cinco dias após a inoculação com *Fusarium* spp., período em que é verificado um acúmulo transiente dessas enzimas devido ao efeito indutor do patógeno (RAMAMOORTHY et al., 2002). As raízes de mudas micropropagadas e aclimatizadas dos porta-enxertos de videira R110 e SO4, livre de substrato e seccionadas a 10 cm do colo, foram imersas em suspensão de 10⁷ conídios mL⁻¹ de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* ou em água estéril por uma hora; em seguida, as mudas foram replantadas nos vasos de origem.

As raízes das mudas de videira foram coletadas 24, 48, 72, 96 e 120 h e imediatamente após a imersão em água estéril ou suspensão de conídios do patógeno. Após lavagem e separação da parte aérea, os tecidos radiculares foram imediatamente acondicionados em recipientes plásticos, pesados e imersos em nitrogênio líquido por cinco segundos a fim de paralisar a atividade metabólica. As amostras de cada coleta foram armazenadas a -40° C até serem analisadas a atividade de quitinases e β -1,3-glucanases e o teor de proteínas totais nas raízes das plantas. Os passos do experimento descritos acima são apresentados graficamente na Figura 6.

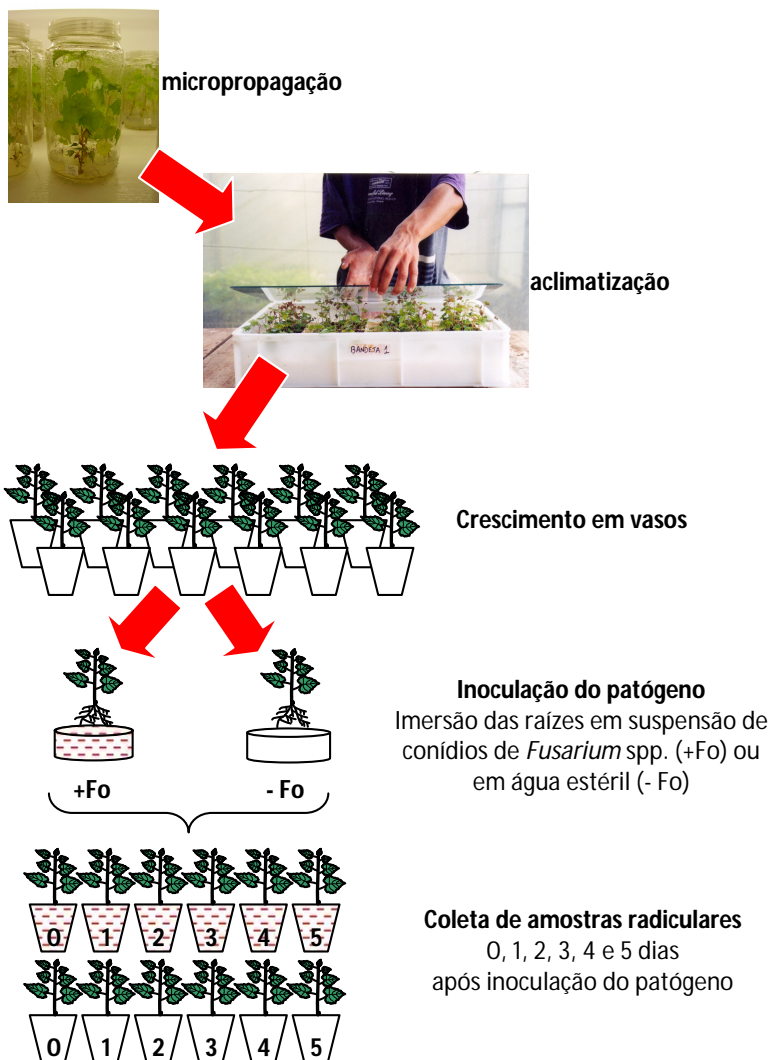


Figura 6. Representação esquemática dos procedimentos de condução do Experimento 1. As etapas foram conduzidas simultaneamente para os porta-enxertos de videira SO4 e R110, que são suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, respectivamente.

Amostras de raízes foram transferidas para almofariz e trituradas após adição de 0,2 g PVPP e nitrogênio líquido; ao pó fino obtido foi adicionada solução extratora não desnaturante de proteínas (1:6, massa de raiz/volume) preparada conforme Schaefer (1977) (em 100 mL de NaOH 0,05 N: 375 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 5 g sacarose; 200 mg EDTA sal dissódico; 60 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$; 80 mg cisteína; 200 mg $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1 g cafeína; pH 9,5). A suspensão resultante foi centrifugada a 10.000 g (0° C, 20 min) e alíquotas do sobrenadante foram retiradas para quantificação do teor de proteínas e ensaios enzimáticos.

Os ensaios enzimáticos para determinação espectrofotométrica da atividade de quitinases (EC 3.2.1.14) e β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39) foram realizados seguindo-se métodos descritos por Guzzo & Martins (1996) e Wirth & Wolf (1992). Alíquotas de 100 μL dos extratos radiculares de videiras foram transferidos para 500 μL de tampão acetato 50 mM pH 5,0 contendo 200 μL solução do substrato enzimático carboximetilquitina-remazol violeta brilhante (CM-Chitin-RBV 2 mg mL^{-1} , Loewe Biochemica GmbH) e em seguida incubadas a 38° C por 2 h. A reação foi interrompida pela adição de HCl 2N e resfriamento por 10 min em congelador. O substrato insolúvel não hidrolisado foi removido por centrifugação a 10.000 g por 5 min em temperatura ambiente. A absorbância λ 550 nm do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro. Como controle foi utilizada solução dos reagentes sem extrato radicular. Os valores de leitura em espectrofotômetro foram ajustados para os teores de proteínas totais dos extratos radiculares e para a massa de raiz de cada amostra. A determinação da atividade de β -1,3-glucanases foi conduzida de forma análoga aos procedimentos descritos para a avaliação de atividade de quitinases, diferenciando-se dessa última por utilizar carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg mL^{-1} , Loewe Biochemica GmbH) como substrato enzimático e estimar a absorbância (λ 600 nm) da coloração azul formada.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos completamente casualizados com sete repetições. Para cada porta-enxerto, o experimento formou um fatorial 2x6, composto por dois tratamentos de inoculação (imersão de raízes em suspensão de conídios de *Fusarium* spp. ou água estéril) e seis períodos de monitoramento das atividades enzimáticas (0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias após imersão das raízes em suspensão de conídios ou em água estéril). Os dados foram submetidos a análise de variância (teste F) e em caso dessa ter sido significativa, foi aplicado teste de separação de médias (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$).

2. Resultados

Não foram constatadas diferenças nos níveis de proteínas totais das raízes de videira entre zero e cinco dias após a inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Figura 7). No porta-enxerto SO4 foi constatado tendência ($p=0,106$) de elevação na concentração de proteínas um dia após a inoculação de *Fusarium* spp., com acúmulo em torno de 30% que o constatado nas plantas não inoculadas e manutenção desse nível nos períodos seguintes de monitoramento (Figura 7).

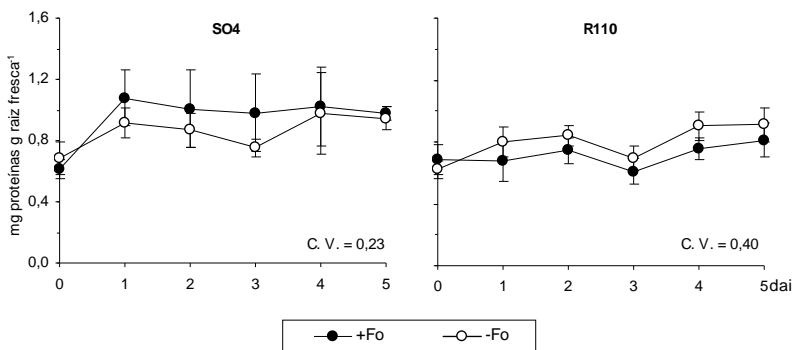


Figura 7. Teores de proteínas totais (mg g raiz fresca⁻¹) de amostras radiculares dos porta-enxertos de videira SO4 e R110, suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, respectivamente, entre zero e cinco dias após inoculação do patógeno (+Fo) ou imersão de raízes em água estéril (-Fo) (dai: dias após inoculação do patógeno).

Os níveis de atividade de quitinases e β -1,3-glucanases relativos à massa de raízes não diferiram entre as plantas inoculadas e não inoculadas do porta-enxerto SO4 (Figuras 8 e 9). No porta-enxerto R110, os níveis médios de atividade de quitinases apresentaram ligeira elevação quatro dias após inoculação de *Fusarium* spp., embora não tenham diferido significativamente das plantas não inoculadas nesse momento de avaliação; essa tendência se manteve no último dia de monitoramento da atividade enzimática (Figura 8). Para esse porta-enxerto, considerando-se todo o período de monitoramento, o perfil da atividade de β -1,3-glucanases foi maior nas plantas inoculadas com o patógeno ($P=0,017$). Aos 4 dias, houve tendência ($P=0,083$) de elevação no nível de atividade dessa enzima nas plantas inoculadas com *Fusarium* spp. (Figura 9).

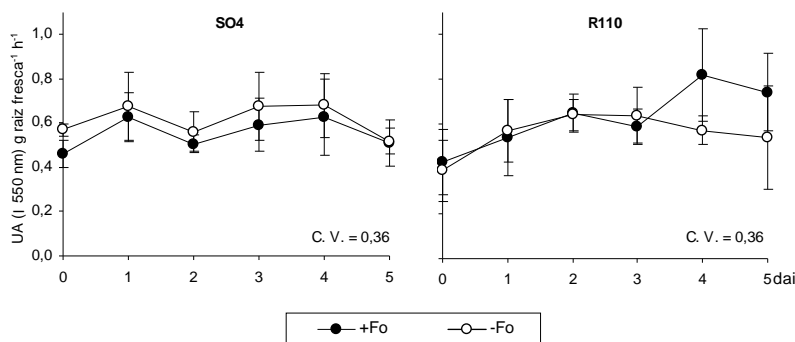


Figura 8. Atividade de quitinases (unidades de absorvância a λ 550 nm g raiz fresca⁻¹ h⁻¹) de amostras radiculares dos porta-enxertos de videira SO4 e R110, suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbementis*, respectivamente, entre zero e cinco dias após inoculação do patógeno (+Fo) ou imersão de raízes em água estéril (-Fo) (dai: dias após inoculação do patógeno).

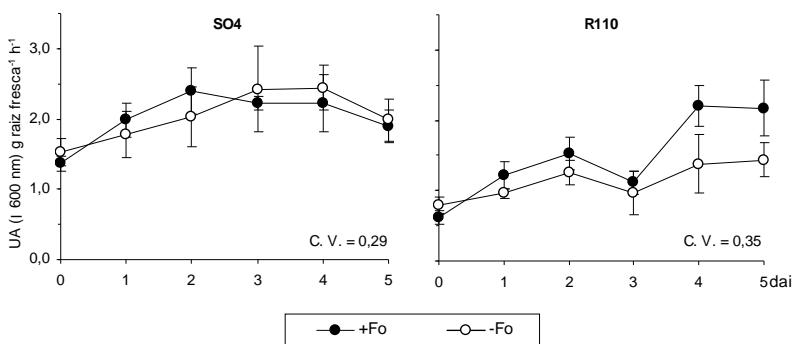


Figura 9. Atividade de β -1,3-glucanases (unidades de absorvância a λ 600 nm g raiz fresca⁻¹ h⁻¹) de amostras radiculares dos porta-enxertos de videira SO4 e R110, suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbementis*, respectivamente, entre zero e cinco dias após inoculação do patógeno (+Fo) ou imersão de raízes em água estéril (-Fo) (dai: dias após inoculação do patógeno).

Os perfis de atividade de quitinases (Figura 10) e β -1,3-glucanases (Figura 11) relativa ao teor de proteínas totais apresentaram padrões mais claros que a razão entre atividade enzimática e a massa radicular das plantas.

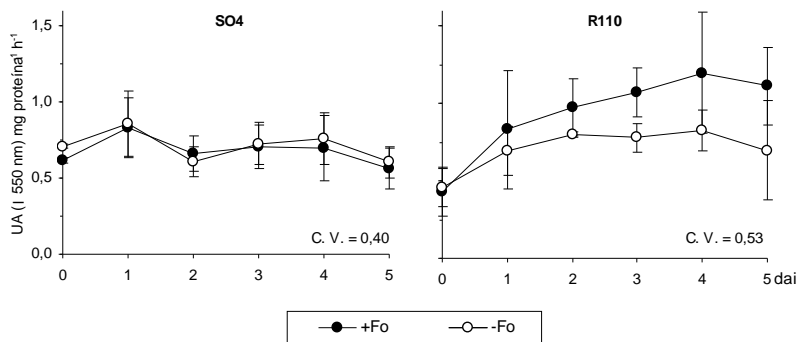


Figura 10. Atividade de quitinases (unidades de absorvância a λ 550 nm mg proteína⁻¹ h⁻¹) de amostras radiculares dos porta-enxertos de videira SO4 e R110, suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, respectivamente, entre zero e cinco dias após inoculação do patógeno (+Fo) ou imersão de raízes em água estéril (-Fo) (dai: dias após inoculação do patógeno).

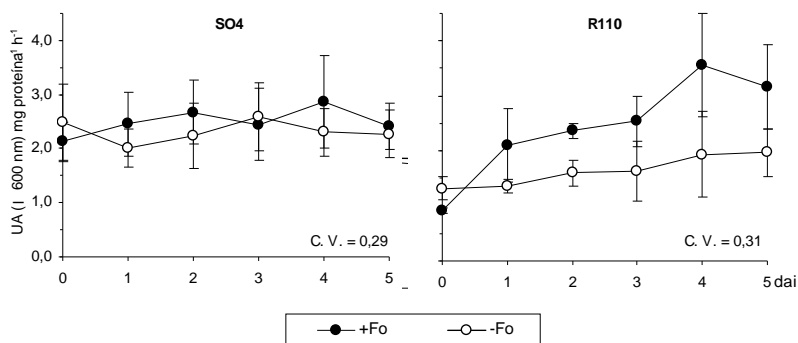


Figura 11. Atividade de β -1,3-glucanases (unidades de absorvância a λ 600 nm mg proteína⁻¹ h⁻¹) de amostras radiculares dos porta-enxertos de videira SO4 e R110, suscetível e resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, respectivamente, entre zero e cinco dias após inoculação do patógeno (+Fo) ou imersão de raízes em água estéril (-Fo) (dai: dias após inoculação do patógeno).

Não houve indução de atividade de quitinases e β -1,3-glucanases nas raízes do porta-enxerto SO4 inoculadas com o patógeno. Na variedade R110, as plantas não inoculadas apresentaram níveis praticamente estáveis de atividade enzimática. Por outro lado, nas videiras inoculadas com o patógeno houve um aumento gradativo até o quarto dia após inoculação de *Fusarium* spp., com ligeira diminuição do nível de atividade enzimática no período de avaliação seguinte.

Considerando-se todo o período de avaliação, os níveis de atividade hidrolítica de quitinases nas raízes do porta-enxerto R110 foram maiores nas plantas inoculadas com o patógeno, ao nível de probabilidade de 6,1%. Essa tendência foi mais clara para a atividade de β -1,3-glucanases, que apresentou níveis mais elevados ($P=0,013$) nas amostras radiculares das mudas de R110 inoculadas com o patógeno, em relação à média da atividade das amostras não inoculadas do mesmo porta-enxerto.

3. Discussão

β -1,3-glucanases e quitinases são enzimas hidrolíticas que promovem a clivagem de glucana e quitina, respectivamente, componentes comuns da parede celular de fungos, fazendo com que essas proteínas relacionadas à patogênese contribuam no processo de resistência bioquímica contra patógenos (LEBEDA et al., 2001). Além de atuar nos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos, quitinases estão relacionadas com outros processos fisiológicos das plantas, tais como geração e degradação de sinais moleculares, resistência ao congelamento e armazenagem de proteínas, embriogênese, germinação das sementes, divisão celular e crescimento vegetativo (VARGHESE et al., 1994; LEUBNER-METZGER & MEINZ, 2000; KASPRZEWSKA, 2003). Isso explicaria a manutenção de níveis basais de atividade dessa enzima durante o período de monitoramento, tanto nas raízes do porta-enxerto SO4 como nas plantas não inoculadas da variedade R110.

No porta-enxerto suscetível a *Fusarium* spp. não houve acúmulo pós-infeccional como verificado nas plantas da variedade R110. Egea et al. (1999) verificaram indução transiente na atividade de β -1,3-glucanases intercelular em variedades de pimentão resistente e suscetível a *Phytophthora capsici*, e os níveis de atividade total dessa enzima foram superiores na variedade resistente, independente do período de avaliação pós-infeccional. Da mesma forma, a atividade de quitinases em raízes de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) foi induzida por *Fusarium*

oxysporum f. sp. *ciceri*, atingindo valores superiores em variedade resistente ao patógeno; a cultivar suscetível também foi induzida, acumulando essa enzima em quantidade equivalente aos níveis basais da variedade resistente (GIRI et al., 1998). Os níveis mais altos de atividade e a expressão diferenciada de isoformas de quitinases e β -1,3-glucanases em variedades resistentes foram constatados em vários patossistemas (TUZUN, 2001), indicando que essa seja a regra.

O aumento na concentração de proteínas relacionadas à patogênese nas raízes das videiras indica que *Fusarium* spp. induziu respostas de resistência no porta-enxerto R110 (Figuras 10 e 11). Em plantas saudáveis, quitinases e β -1,3-glucanases são acumuladas no apoplasto e a produção endógena dessas enzimas é estimulada pela infecção por patógenos; a localização intercelular permite formar o “front” de defesa contra o ataque de patógenos e gerar sinais moleculares capazes de ativar, no interior da célula, outros mecanismos para impedir o avanço e suprimir o desenvolvimento de patógenos (KRISHNAVENI et al., 1999; LEBEDA et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese ocorre principalmente entre três e cinco dias após a indução com o patógeno. Os níveis de atividade de quitinases e β -1,3-glucanases em folhas de bananeiras atingiram valor máximo três dias após a inoculação das raízes das plantas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, sendo que e em seguida declinou a níveis semelhantes à testemunha, cuja atividade enzimática manteve-se estável durante todo o período de avaliação (THANGAVELU et al., 2003). Em raízes de tomate, a atividade dessas duas enzimas e de peroxidase alcançou os maiores níveis entre três e cinco dias e quatro e cinco dias após a inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, respectivamente, diminuindo gradualmente nos dias seguintes (RAMAMOORTHY et al., 2002). Em plântulas de trigo, Caruso et al. (1999) detectaram a expressão de duas isoformas de β -1,3-glucanases e três isoformas de quitinases quatro dias após a inoculação com *Fusarium culmorum*. Raízes de sorgo inoculadas com espécies patogênicas de *Fusarium* atingiram valores máximos de atividade de β -1,3-glucanases quatro dias após a inoculação do patógeno (KRISHNAVENI et al., 1999). Todos os autores acima relacionaram o acúmulo transiente da enzima com a reação de defesa para impedir o desenvolvimento do patógeno.

O aumento transiente na expressão de quitinases e β -1,3-glucanases, relacionado com o tempo após a indução causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, pode indicar que essas enzimas

estão envolvidas na reação de defesa contra o patógeno. O acúmulo conjunto de quitinases e β -1,3-glucanases foi relacionado a um efeito sinérgico dessas enzimas na supressão de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomate (JONGEDIJK et al., 1995) e de *Colletotrichum lagenarium* em pepino (JI & KUC, 1996). O fato de esse fenômeno ter sido constatado somente no porta-enxerto R110 indica que a síntese de quitinases e β -1,3-glucanases pode constituir uma estratégia de supressão de infecção das videiras pelo patógeno.

De forma semelhante aos trabalhos de Jongedijk et al. (1995) e Ji & Kuc (1996) anteriormente citados, Mauch et al. (1988) constataram efeito sinérgico de quitinases e de β -1,3-glucanases na inibição do crescimento *in vitro* de *F. solani* f. sp. *pisi* e *F. solani* f. sp. *phaseoli*. Essas enzimas foram purificadas de raízes de ervilha e os fungos acima são, respectivamente patogênico e não-patogênico à espécie vegetal. Os autores concluíram que a patogenicidade diferenciada desses fungos não deriva da sensibilidade deles às enzimas produzidas pela ervilha. Em outras palavras, plantas suscetíveis podem acumular proteínas de ação antifúngica e mesmo assim não impedirem o progresso dos patógenos. Tal fenômeno ocorre porque os patógenos possuem estratégias para anular a ofensiva vegetal como, por exemplo, compostos que inibem diretamente a ação de proteínas relacionadas à patogênese ou o processo de sinalização que leva à resistência (DI PIETRO et al., 2003). Assim, a resistência de plantas pode envolver o efeito sinérgico da atividade de quitinases e de β -1,3-glucanases, não de forma isolada, mas em conjunto com outras estratégias que suprimem o desenvolvimento de doenças. Isso poderia ser a situação constatada neste trabalho, no qual a variedade suscetível a *Fusarium* spp. apresentou níveis basais de β -1,3-glucanases em um patamar mais alto que a variedade resistente.

A constatação de picos de acúmulo de proteínas e de maior atividade hidrolítica de quitinases e β -1,3-glucanases, aos 4 dias após a inoculação do patógeno, atendeu o objetivo inicial do experimento e serviu de informação ao experimento seguinte do trabalho de tese.

EXPERIMENTO 2: Perfis de expressão de proteínas radiculares e indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. herbemontis em genótipo de porta-enxerto de videira micorrizado com *Glomus intraradices*

1. Material e Métodos

1.1. Recursos biológicos

1.1.1. Porta-enxerto de videira

O porta-enxerto SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*), que apresenta suscetibilidade a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (ANDRADE et al., 1993; GRIGOLETTI JR., 1993), foi micropropagado *in vitro*. As plantas matrizes foram provenientes do programa de melhoramento de videira da Universidade de Davis, Califórnia (EUA), e do Istituto Agrário San Michele de all'Adige (Província Autônoma de Trento – Itália) e foram introduzidas *in vitro*, a partir de culturas de meristemas, pelo Laboratório de Morfogênese Vegetal do Departamento de Fitotecnia, CCA - UFSC.

Explantos do porta-enxerto de videira foram micropropagados mediante a transferência de segmentos nodais com duas gemas em vidros contendo 30 mL de meio de cultura DSD1 (LIMA DA SILVA & DOAZAN, 1995) acrescido de sacarose (20,0g L⁻¹) e ágar-ágar (6 g L⁻¹). Após 45 a 60 dias de cultivo em sala de cultura (temperatura de 25 ± 1°C, 16 h luz dia⁻¹, luminosidade incidente de 40 a 45 μmol m⁻² s⁻¹ ao nível do frasco), de acordo com o vigor de crescimento de cada porta-enxerto, as mudas de videira foram aclimatizadas ao ambiente *ex vitro*.

Mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram aclimatizadas em substrato a base de substrato orgânico comercial (Plantamax®), NITOSSOLO VERMELHO Distroférico, areia (2:1:2, v/v/v). Nessa etapa, parte das plantas recebeu na região das raízes em torno de 2 g de inóculo do fungo micorrízico *Glomus intraradices*, formando o tratamento de videiras micorrizadas (+Gi). O outro grupo de videiras formou o controle (-Gi), que teve a microbiota não-micorrízica reconstituída pela adição de 2 mL de suspensão filtrada do inoculante micorrízico (10 g L⁻¹, filtro Whatmann n° 1). O inoculante micorrízico de isolado do fungo *Glomus intraradices* N.C. Schenck & G.S. Sm. utilizado no trabalho é proveniente do Centro de Pesquisa do INRA de Dijon, França. O inoculante micorrízico é constituído da mistura do

substrato de crescimento e do sistema radicular do hospedeiro vegetal (*Allium porrum*) utilizado na multiplicação do isolado de fungo micorrízico.

Após 30 dias, no término da aclimatização, as plantas foram transferidas a vasos contendo 400 mL do mesmo substrato e as plantas previamente inoculadas com o fungo micorrízico receberam novamente 2 g de inóculo de *G. intraradices*. As plantas permaneceram por 45 dias em crescimento nessas condições, recebendo água a cada dois dias e 2 mL de solução nutritiva de Long Ashton (SMITH et al., 1983) semanalmente, com 10% da concentração original de fósforo.

1.1.2. Inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*

Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* foram fornecidos em meio de cultura pela EMBRAPA Uva e Vinho de Bento Gonçalves/RS. Fragmentos do meio de cultura contendo as estruturas do fungo foram transferidos a tubos dos tipos eppendorf e falcon contendo mistura estéril de solo/fertilizante cama de aviário/areia (1:1:1, v/v/v), conforme procedimento descrito por Grigoletti Jr. (1985). Os tubos permaneceram por 3 semanas em câmara de crescimento (25° C, 12 h luz dia⁻¹) para crescimento do fungo e em seguida foram transferidos a 4° C para conservação até o momento de uso.

Para produção de inóculo do patógeno, fração da mistura solo/fertilizante cama de aviário/areia contendo micélio e conídios de *Fusarium* spp. foi ressuspensa em água estéril e 0,2 mL de suspensão foi distribuído, com auxílio de alça de Gridalski, na superfície de placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Após seis dias de cultivo em câmara de crescimento (temperatura 25±2° C, intensidade luminosa de 150 µmol m⁻², fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹), foi realizada a adição de 15 mL de água em cada placa e a raspagem superficial do micélio de *Fusarium* spp. A suspensão obtida, ajustada para a concentração de 1,0 x 10⁷ conídios mL⁻¹ com auxílio de câmara de Neubauer, forneceu o inóculo do patógeno.

1.2. Procedimentos experimentais

Após 45 dias do término da aclimatização das mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4, foi realizada a inoculação do patógeno; raízes livres de solo, podadas a 10 cm do colo da planta foram imersas por cinco minutos em suspensão de conídios produzida conforme descrito anteriormente (GRIGOLETTI JR., 1985). Plantas controle

tiveram as raízes imersas em água estéril pelo mesmo tempo.

O experimento formou um fatorial 2x2, composto por dois tratamentos de inoculação de FMA (+Gi e -Gi) e dois de inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (+Fo e -Fo). As mudas de videira foram divididas em quatro grupos, de acordo com o período de coleta de amostras radiculares: mudas não submetidas à imersão em água ou suspensão de conídios do patógeno, que constituíram plantas controle (+Gi; -Gi) e foram amostradas no dia da inoculação do patógeno; e mudas amostradas aos 4, aos 14 e aos 90 dias após inoculação do patógeno (dai) ou imersão em água (tratamentos +Gi +Fo; +Gi -Fo; -Gi +Fo; -Gi -Fo). Os passos do experimento descritos acima são apresentados graficamente na Figura 12.

As variáveis analisadas foram: biomassa fresca e seca e concentração de nutrientes em tecidos da parte aérea e do sistema radicular; colonização micorrízica; atividade de quitinases e β -1,3-glucanases; volume relativo de bandas em perfis protéicos de amostras radiculares após eletroforese bidimensional; e índice de doença para sintomas de *Fusarium* spp. Os períodos de amostragem para avaliação de cada variável são apresentados na Tabela 1.

Os tratamentos foram distribuídos em delineamento completamente casualizado e formados por cinco repetições cada. Para os perfis protéicos, foram usadas quatro repetições por tratamento. Os dados foram submetidos a análise de variância (teste F) e em caso dessa ter sido significativa, foi aplicado teste de separação de médias (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$). O experimento foi repetido duas vezes.

Tabela 1. Variáveis analisadas no Experimento 2 e respectivos períodos de amostragem após a inoculação do patógeno. Mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* e amostradas no momento da inoculação (0 dai), 4, 14, 14 e 90 dias após a inoculação do patógeno (dai).

Variáveis analisadas	períodos de amostragem			
	0 dai	4 dai	14 dai	90 dai
Acúmulo de biomassa fresca e seca	X	X	X	X
Concentração de nutrientes	X	X	X	X
Taxa de colonização micorrízica	X	X	X	X
Atividade de quitinases e β -1,3-glucanases		X		
Eletroforese bidimensional e perfis protéicos	X		X	
Índice de doença - sintomas internos e externos de <i>Fusarium</i> spp.				X

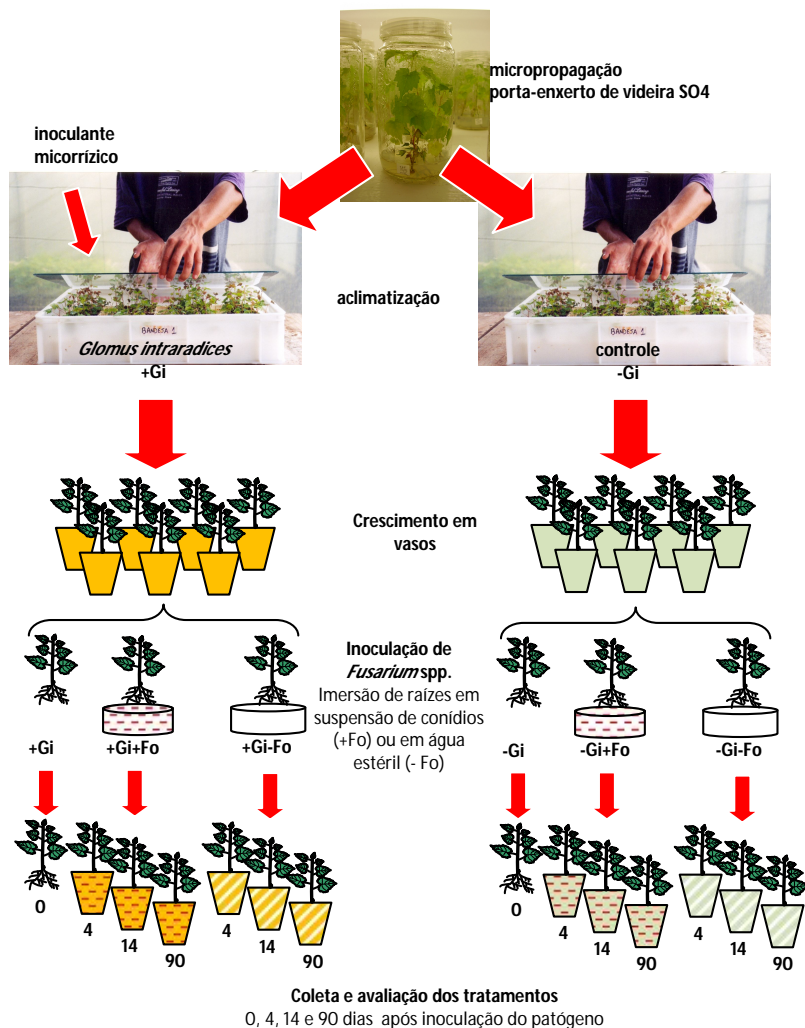


Figura 12. Representação esquemática dos procedimentos de condução do Experimento 2. +Gi: videiras inoculadas com *Glomus intraradices*; -Gi: controle desse tratamento, formado por plantas que não receberam inoculante micorrízico e tiveram a microbiota não-micorrízica reconstituída; +Fo: videiras que tiveram o sistema radicular inoculado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemonitis*; -Fo: controle desse tratamento, no qual o sistema radicular das plantas foram imersos em água estéril.

1.3. Amostragens e análises de material vegetal

1.3.1. Biomassa e concentração de nutrientes de tecidos vegetais

Amostras coletadas aos 0, 4, 14 e 90 dai foram avaliados quanto o acúmulo de biomassa fresca e seca e de nutrientes na parte aérea e no sistema radicular. Para obtenção de biomassa seca, o material vegetal permaneceu em estufa a 60° C por 72 h e imediatamente foram pesadas.

Amostras da parte aérea e do sistema radicular de plantas micorrizadas e não micorrizadas compostas de cinco e 12 subamostras, respectivamente, com massas entre 1,5 e 5,0 g, foram encaminhadas à análise de concentrações de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu e B no Laboratório de Análise de Tecidos Vegetais da Estação Experimental EPA-GRI - Caçador/SC.

1.3.2. Colonização micorrízica

Os fragmentos de raízes provenientes da poda das plantas, no momento da imersão do sistema radicular em suspensão de conídios ou em água, foram conservados em álcool 50% para análise da taxa de colonização micorrízica. As raízes foram cortadas em fragmentos e submetidas à descoloração mediante imersão em KOH 10% por 24 h a temperatura ambiente e a 121° C por 30 min na mesma solução. Após lavagem em água corrente, as raízes permaneceram 2 horas em H₂O₂ 2% a temperatura ambiente. As raízes foram novamente lavadas em água corrente e em seguida acidificadas com HCl 2% a temperatura ambiente por 16 h, e submetidas à coloração com solução acidificada de glicerol contendo 0,05% de azul de tripano, a 90° C por 25 minutos (KOSKE & GEMMA, 1989).

A taxa de micorrização dos fragmentos radiculares foi estimada de acordo com método proposto por Trouvelot et al. (1986) mediante montagem de lâminas contendo 10 fragmentos em PVLG (solução de ácido láctico 50%, glicerol 5% e álcool polivinílico 8% a 121°C, 15 min) e observação ao microscópio óptico.

1.3.3. Atividade de quitinases e β -1,3-glucanases

Amostras radiculares das mudas de videira com aproximadamente 1 g de massa fresca foram coletadas aos 4 dai e submetidas a avaliação da atividade enzimática de acordo com a metodologia e as conclusões do Experimento 1, referente ao monitoramento da atividade de

quitinases e β -1,3-glucanases em raízes de videiras inoculadas com *Fusarium* spp.

Após remoção do solo e separação da parte aérea, o sistema radicular das plantas foi lavado em água corrente para retirada de fragmentos de substrato, imerso em água destilada e, por último, em água deionizada. Após secagem com papel-toalha, os tecidos radiculares foram seccionados com auxílio de bisturi e pesados em amostras individualizadas. Imediatamente após pesagem, as amostras foram acondicionadas em tubos do tipo falcon de 15 mL, imersos em nitrogênio líquido por cinco segundos e armazenadas a -80°C até as avaliações posteriores.

1.3.4. Extração fenólica, eletroforese bidimensional de proteínas e perfis protéicos

Amostras de aproximadamente 2 g de massa fresca de tecidos radiculares foram coletadas aos 0 e 14 dai, conforme procedimentos descritos no item anterior para remoção de solo e separação da parte aérea e limpeza e estocagem a -80°C de amostras radiculares. Para os tratamentos com plantas não micorrizadas, as amostras foram compostas de duas subamostras devido ao menor desenvolvimento das raízes.

A extração de proteínas totais de amostras radiculares de videiras foi conduzida no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA - UFSC, seguindo protocolo de extração fenólica proposto por Nagaraj et al. (2007) e sugestões de procedimentos descritos por Isaacson et al. (2006) e Faurobert et al. (2007) para extração de proteínas de material recalcitrante.

Amostras radiculares armazenadas a -80°C foram transferidas a almofariz e maceradas com auxílio de pistilo após adição de nitrogênio líquido; o procedimento foi repetido por quatro vezes, até se obter um pó fino e branco. Esse material foi homogeneizado com 10 mL de tampão de extração de proteínas (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; Sacarose 0,7 M; KCl 0,1 M; Tiouréia 10 mM; EDTA 5 mM; β -mercaptoetanol 2%; PMSF 1 mM) mantida a 4°C .

A suspensão obtida foi transferida a tubo do tipo falcon de 50 mL no qual foi acrescentado 10 mL de fenol saturado com Tris-HCl, pH 7,65 (Amresco Inc., K168). O frasco foi mantido sob agitação horizontal (30 minutos, 220 rpm, 4°C). Em seguida, a suspensão foi centrifugada (60 minutos, 3.150 g, 4°C) e a fase fenólica superior foi coletado cuidadosamente, evitando-se remoção de material no menisco. A essa fase adicionaram-se 10 mL de tampão de extração de proteínas e em seguida repetiram-se os procedimentos de agitação e centrifugação. A fase fenó-

lica coletada foi transferida a tubo do tipo falcon de 50 mL ao qual foram adicionados 5 volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol a -20°C. Após mistura por inversão do tubo, a suspensão permaneceu por uma noite a -20° C. Em seguida, as proteínas foram precipitadas por centrifugação (60 minutos, 3.150 g, 4°C) e transferidas a tubo do tipo eppendorf.

O *pellet* foi lavado três vezes com 2 mL de acetona a -20° C contendo 0,2% de DTT, por meio de ressuspensão em vórtex, precipitação por 30 minutos a -20°C e centrifugação (cinco minutos, 12.000 g, 4° C). O *pellet* foi seco e concentrado por meio de vácuo e em seguida suspenso em 200 µL de tampão de solubilização (uréia 7 M; tiouréia 2 M; PMSF 2 mM; Pharmalyte ® pH 3-10, 0,5%; Triton X-100, 2%) por meio de vórtex durante 4 horas a 20° C. A suspensão de proteínas foi armazenada a -20° C até os procedimentos seguintes de determinação de concentração de proteínas e eletroforese bidimensional.

Para a quantificação do teor de proteínas, 5 µL da suspensão de proteínas foram adicionados a 10 µL de HCl 0,1 M e 85 µL de água e homogeneizados em 3,5 mL de reagente de Bradford, de acordo com o procedimento modificado de Bradford (1976) por Ramagli & Rodriguez (1985). Após 10 min em ambiente escuro, foi procedida, em espectrofotômetro, a leitura de absorbância (λ 595 nm) da solução. Os valores obtidos foram corrigidos para µg de proteínas 100 µL⁻¹, a partir da construção de curva de calibração com padrões protéicos de albumina de soro bovino.

O volume da suspensão protéica relativo a 700 µg de proteínas foi homogeneizado com tampão de reidratação (uréia 7 M; tiouréia 2 M; Triton X-100 2%; CHAPS 2%; tampão IPG pH 3-10, 0,5%; azul de bromofenol 0,002%; DTT 1%) para um volume final de 250 µL e mantidos por uma noite a temperatura ambiente em reidratação com tiras de gel de 13 cm, gradiente de pH imobilizado e escala linear de separação para pH 3 a 10 (GE Healthcare, 17-6001-14).

\Para a primeira dimensão de eletroforese, a tira de gel reidratada foi submetida à focalização isoeétrica em uma unidade Ettan-IPGPhor (GE Healthcare) a 20 °C com corrente elétrica limitada a 50 mA por tira e ajuste de voltagem de 500 V a 0.5 kWh, 1.000 V a 0.8 kWh, 8.000 V a 13.5 kWh e 8.000 V a 20 kWh. A tira de gel foi reduzida por 15 minutos, sob leve agitação, em 3 mL de solução de equilíbrio (Tris-HCl 75mM pH 8,8; uréia 6 M; glicerol 30%; SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) contendo DTT 125 mM e em seguida, nas mesmas condições, foi alquilada em solução de equilíbrio contendo iodoacetamida 125 mM.

Para a segunda dimensão, a tira de gel foi transferida a superfície de gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (Tris-HCl 375 mM pH 8,8; acrilamida 12%; bis-acrilamida 0,32%; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; TEMED 0,04%) e sob gel de agarose contendo azul de bromofenol 0,01%. A eletroforese foi realizada em cuba SE 600 Ruby (GE Healthcare) a 4° C, com solução-tampão contendo Tris 0,025 M glicina 0,2 M e SDS 0,1%, aplicando-se corrente elétrica na intensidade de 12,5 mA por gel durante 30 minutos e 25 mA por gel até a linha de azul de bromofenol atingir 1 mm da base inferior do gel. Em cada gel, marcadores de massa molecular com proteínas padrões entre 10 e 250 kDa (BioRad, 161-0363) foram submetidas à co-eletroforese.

As proteínas foram reveladas com o uso do corante azul de Coomassie (Coomassie G-250 1%; H₃PO₄ 0,1 N; (NH₄)₂SO₄ 0,6 M; metanol 20%) durante 96 h, após incubação do gel por 12 h em solução de fixação (metanol 50%; ácido acético glacial 12%). Em seguida, o gel foi lavado em água destilada até retirada do excesso de corante, em Tris-H₃PO₄ 0,1 M, pH 6,5 por três minutos, em metanol 25% por um minuto e (NH₄)₂SO₄ 20% por três minutos. O gel foi descorado com lavagem em água destilada por 96 horas e armazenado em (NH₄)₂SO₄ 20% a 4° C até digitalização.

A análise dos géis foi realizada por meio da digitalização em ImageScanner® (GE Healthcare) e do programa ImageMaster® 2D Platinum v 7.0 (versão teste). Os peptídeos, observáveis na forma de bandas individuais no gel, foram agrupados de acordo com a localização no gel pela aplicação do programa e em seguida por inspeção visual.

Em cada repetição biológica foram selecionados três géis por tratamento, de acordo com a qualidade de visualização das bandas, totalizando dessa maneira seis géis por tratamento. Foi registrado o volume relativo de cada banda, em percentagem do volume total de bandas do gel correspondente, o que fornece resultados independentes de variações devido às diferenças no carregamento e na coloração das proteínas. O ponto isoeletrico (pI) e massa molecular (MM) experimentais das bandas foram calculados pelo programa de acordo com os marcadores utilizados.

As bandas presentes em tratamentos específicos, de acordo com a combinação de inoculação de *G. intraradices* e/ou *Fusarium* spp., foram consideradas induzidas. Os dados foram normalizados e diferenças no nível de expressão de proteínas foram consideradas nas situações em que as médias de volume relativo das bandas apresentaram diferenças significativas pelo teste aplicado (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$) e razão superior a dois ou inferior a 0,5 com os respectivos controles.

1.3.5. Sintomas externos e internos de ataque por Fusarium spp.

Os critérios de avaliação de sintomas internos e externos da presença de infecção por *Fusarium* spp. foram aqueles adotados como índices de doença apresentados por Grigoletti Jr. (1985). As notas e respectivos sintomas utilizados na avaliação do experimento foram as seguintes:

Sintomas externos:

1. ausência de sintomas na planta;
2. redução no crescimento da planta;
3. amarelecimento das folhas basais;
4. amarelecimento generalizado e/ou necrose nos bordos das folhas e/ou abscisão foliar;
5. morte da planta.

Sintomas internos:

1. ausência de sintomas nas raízes;
2. descoloração vascular restrita às raízes inoculadas;
3. descoloração vascular na base da estaca, próximo à inserção das raízes;
4. descoloração vascular na parte mediana da estaca, logo acima da superfície do solo;
5. descoloração vascular na parte apical da estaca.

De acordo com esses critérios, na avaliação de resistência e suscetibilidade de genótipos de videira a *Fusarium* spp., são consideradas resistentes as plantas que apresentam notas de 1 a 2, intermediárias as com nota 3 e suscetíveis as com nota 4 e 5.

2. Resultados

2.1. Biomassa do sistema radicular e da parte aérea e colonização micorrízica

O crescimento de videiras micorrizadas com *Glomus intraradices*, avaliado pelo acúmulo de biomassa no momento da inoculação do patógeno, aos 45 dias do final da aclimatização *ex vitro*, comprova a eficiência da micorrização do porta-enxerto e a aplicabilidade dessa biotecnologia à produção de mudas micropropagadas de videiras (Figuras 13 e 14). A presença de hifas e arbúsculos no córtex radicular em taxas elevadas indicam a formação de micorrizas funcionais (Figuras 14 e 15). Os valores corroboram os resultados constatados em estudos anteriores (SCHUBERT et al., 1988; LINDERMAN & DAVIS, 2001; AGUÍN et al., 2004; CAMPRUBÍ et al., 2008).

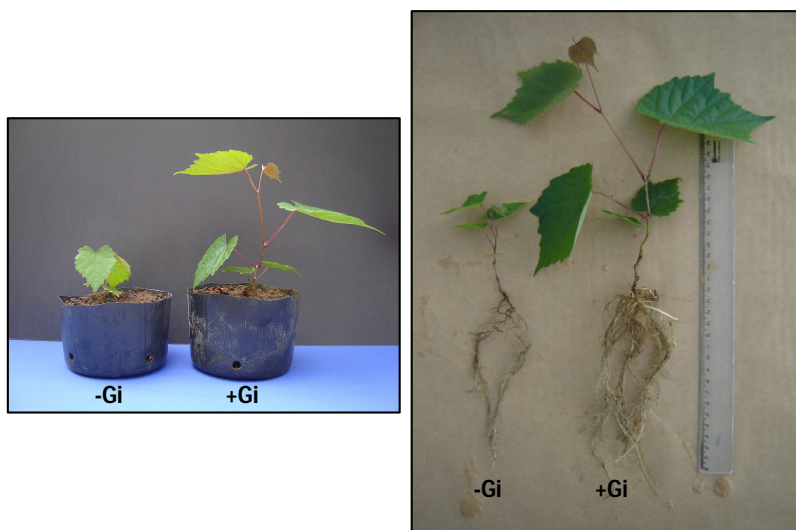


Figura 13. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 não micorrizadas (-Gi) ou micorrizadas com *Glomus intraradices* (+Gi) após 45 dias do final da aclimatização *ex vitro*. Fonte: fotografias do autor.

O vigor de plantas micorrizadas é reflexo do aumento na absorção de nutrientes (Tabela 2). No geral, constatou-se maior acúmulo de macronutrientes em plantas micorrizadas e de micronutrientes nas não micorrizadas.

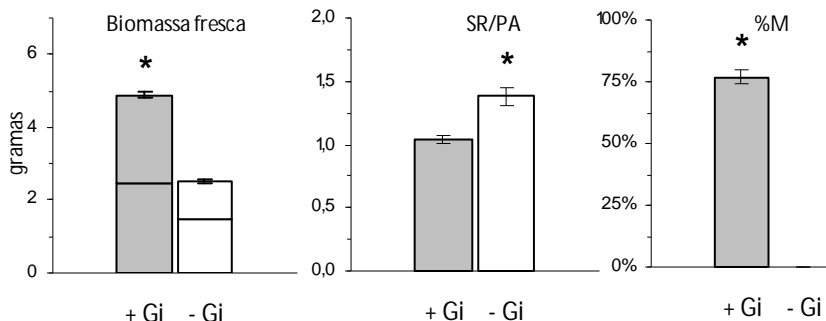


Figura 14. Biomassa fresca (g), relação entre biomassas fresca do sistema radicular e da parte aérea (SR/PA) e taxa de colonização do córtex radicular (M%) de mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 após 45 dias da inoculação (+Gi) ou não (-Gi) de *Glomus intraradices* na fase de aclimatização *ex vitro*. Para biomassa fresca, colunas inferiores e superiores representam biomassas do sistema radicular e da parte aérea, respectivamente. Barras indicam erro-padrão; asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$; $n = 8$).

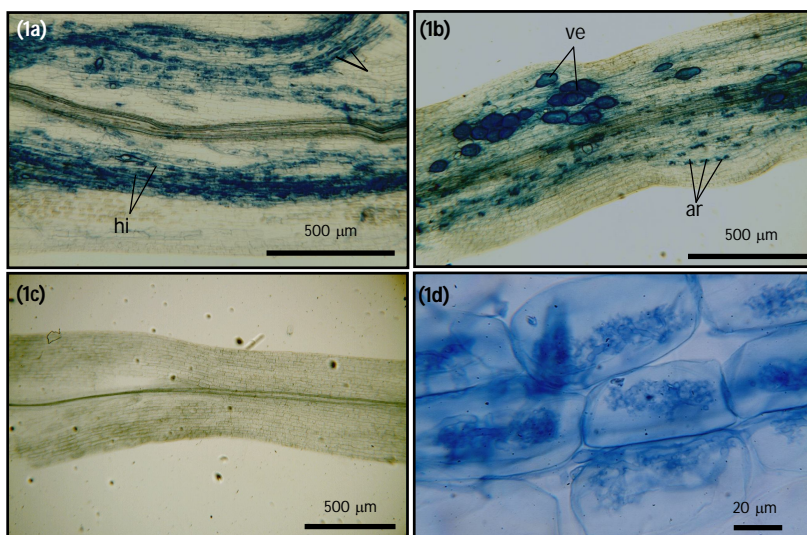


Figura 15. Colonização micorrízica por *Glomus intraradices* em tecidos radiculares do porta-enxerto de videira SO4. 1a e 1b: arbúsculos (ar), hifas intrarradiculares (hi) e vesículas (ve) de *Glomus intraradices*. 1c: raiz de videira não micorrizada. 1d: detalhe de região do córtex radicular com alta concentração de arbúsculos de *Glomus intraradices*. Fonte: fotografias do autor.

Tabela 2. Concentração de macro (g kg^{-1}) e micronutrientes (mg kg^{-1}) em tecidos da parte aérea e do sistema radicular e eficiência micorrízica (+Gi/-Gi) de mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 micorrizadas (+Gi) ou não micorrizadas (-Gi) com *Glomus intraradices* após 45 dias do término da fase de aclimatização *ex vitro*.

Tratamentos ^(a)	Macronutrientes (g kg^{-1}) ^(b)					Micronutrientes (g kg^{-1}) ^(b)				
	N	P	K	Ca	Mg	K/Mg	Fe	Mn	Zn	B
Parte aérea										
+Gi	28,8	2,6**	15,3*	8,8	3,5	4,3**	410	306	33	49
-Gi	nd	1,6	9,7	8,5	4,1	2,4	850**	476**	48	76**
C. V. ^(c)	--	0,11	0,22	0,27	0,11	0,15	0,22	0,13	0,48	0,15
Sistema radicular										
+Gi	21,5	1,5*	20,6*	8,4*	3,1*	6,6	1.300	164	36	31
-Gi	17,4	1,1	8,2	4,8	1,7	4,7	1.114	202	50	44
C. V.	0,27	0,20	0,33	0,23	0,11	0,24	0,31	0,39	0,37	0,41
Biomassa total										
+Gi	25,1	2,1**	18,0*	8,6	3,3	5,5*	855	235	35	41
-Gi	nd	1,3	9,0	6,7	2,9	3,5	982	339*	49	60*
C. V.	--	0,13	0,27	0,24	0,10	0,19	0,24	0,19	0,38	0,15
+Gi/-Gi ^(d)										
	--	1,56	2,01	1,29	1,12	1,55	0,87	0,69	0,70	0,68

nd – não determinado.

^(a) +Gi, n = 5; -Gi, n = 3.

^(b) asteriscos indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste F; * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$).

^(c) coeficiente de variação.

^(d) razão entre as concentrações de nutrientes das biomassas totais de plantas micorrizadas e não micorrizadas.

2.2. Atividade de quitinasases e β -1,3-glucanases

A micorrização e a inoculação do patógeno implicaram em diferenças na concentração de proteínas em amostras radiculares: o nível foi 35% maior em plantas não micorrizadas, em comparação a plantas micorrizadas, e 44% maior nas videiras inoculada com o patógeno, em comparação ao controle (Figura 16). O perfil de atividade hidrolítica foi diferente entre as enzimas quitinasases e β -1,3-glucanases. A presença dos microrganismos mutualístico ou patogênico, associado ao sistema radicular ou inoculado, induziram a expressão de quitinasases acima dos níveis basais. A atividade de β -1,3-glucanases, por outro lado, foi maior somente nas plantas micorrizadas e inoculadas com o patógeno (Figura 16).

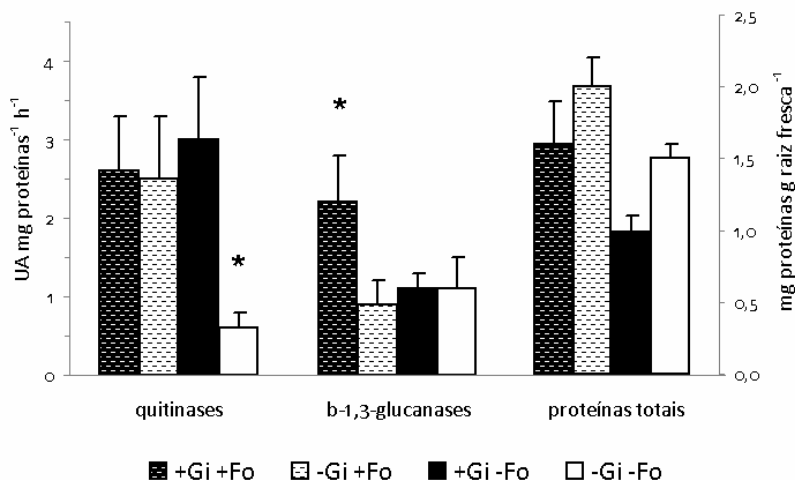


Figura 16. Atividade enzimática de quitinasases e β -1,3-glucanases (unidades de absorvância mg proteínas⁻¹ h⁻¹) e teores de proteínas totais (mg g raiz fresca⁻¹) de amostras radiculares de mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Fo). Avaliação foi realizada quatro dias após a inoculação do patógeno. Unidades de absorvância (UA) da atividade hidrolítica de quitinasases e β -1,3-glucanases estimadas a 550 nm e 600 nm, respectivamente. Barras indicam erro-padrão; asterisco indica tratamento com diferença significativa em relação aos demais (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$; $n = 10$).

2.3. Extração fenólica, eletroforese bidimensional e perfis protéicos

Não foram observadas diferenças na concentração de proteínas entre as amostras radiculares submetidas à extração fenólica e solubilização em solução-tampão para eletroforese bidimensional posterior (Tabela 3). Géis com perfis protéicos obtidos após eletroforese, representando os tratamentos avaliados, são apresentados na Figura 15. Nos Anexos B, C, D, E, F e G são apresentadas todas as repetições de géis bidimensionais utilizadas na análise dos perfis protéicos de volume relativo de bandas de proteínas e presença de bandas induzidas dos tratamentos testados. A análise dos géis bidimensionais detectou 580 bandas de proteínas; desse total, 135 foram observados em todos os perfis protéicos analisados (Tabelas 4, 5 e 6 e Anexo A); 70% das bandas apresentaram massa molecular entre 30 e 60 kDa e mais de 80% das bandas foram observadas na faixa de *pI* entre 4 e 7.

Tabela 3. Teores de proteínas totais obtidos a partir de extração fenólica de amostras radiculares de mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *F. oxysporum* (Fo). Avaliações foram realizadas no momento da inoculação (0 dai) e aos 14 dias (14 dai) após a inoculação do patógeno.

tratamentos	proteínas totais (mg g raiz ⁻¹) ^(a)	tratamentos	proteínas totais (mg g raiz ⁻¹) ^(a)
0 dai +Gi	1,5 ± 0,1	14 dai +Gi +Fo	1,2 ± 0,1
		-Gi +Fo	1,0 ± 0,1
-Gi	1,5 ± 0,2	+Gi -Fo	1,2 ± 0,1
		+Gi +Fo	1,2 ± 0,1
C. V. ^(b)	0,18	C. V.	0,25

^(a) média ± erro-padrão; n=8.

^(b) coeficiente de variação.

A inoculação de *Glomus intraradices* (Tabela 4), de *Fusarium* spp. (Tabela 5) e da combinação dos dois simbiontes (Tabela 6) promoveram mudanças no padrão de expressão de 41 proteínas, considerando-se alterações no nível basal de proteínas acima de fator igual a dois e a indução de bandas de proteínas, isto é, não constatadas nos respectivos controles. A inoculação de *Fusarium* spp., independente da formação micorrizas, promoveu a elevação do nível basal de uma banda de proteína (NI 028) e a diminuição de outra (NI 196). Duas proteínas (NIs 323 e 324) foram induzidas por *Fusarium* spp. no sistema radicular de videiras (Tabela 4).

Tabela 4. Número de identificação (NI), ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MM) e volume relativo (%) de bandas de proteínas do sistema radicular de videiras reguladas pela infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemonitis*. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium* spp. (Fo) e amostradas no momento da inoculação (0 dia) e aos 14 dias (14 dia) após a inoculação do patógeno.

NI	0 dai				P ^(a)				14 dai				P ^(a)				mudança ^(b)	
	pI	MM	-Gi		+Gi		-Gi-Fo	+Gi-Fo	-Gi+Fo	+Gi+Fo	Gi	Fo	Gi x Fo					
028	6,7	21	0,09	0,13	ns			0,04	0,01	0,16	0,25	ns	***	ns	+			
196	6,0	58	0,45	0,32	ns			0,75	0,49	0,11	0,33	ns	*	ns	-			
323	6,5	45	0	0			0	0	0	0,06	0,12	ns		ns	I			
324	6,3	67	0	0			0	0	0	0,05	0,10	Ns		Ns	I			

^(a) Probabilidade, de acordo com teste F, para as causas de variação Gi, Fo ou Gi x Fo em cada amostragem (0 e 14 dia); n=6.
* P<0,05; *** P<0,001; ns, não significativo.
^(b) “+”, “-” e “.” simbolizam aumento e diminuição no nível de expressão de bandas de proteínas em plantas micorrizadas, respectivamente; I – bandas de proteínas induzidas por *Fusarium* spp.

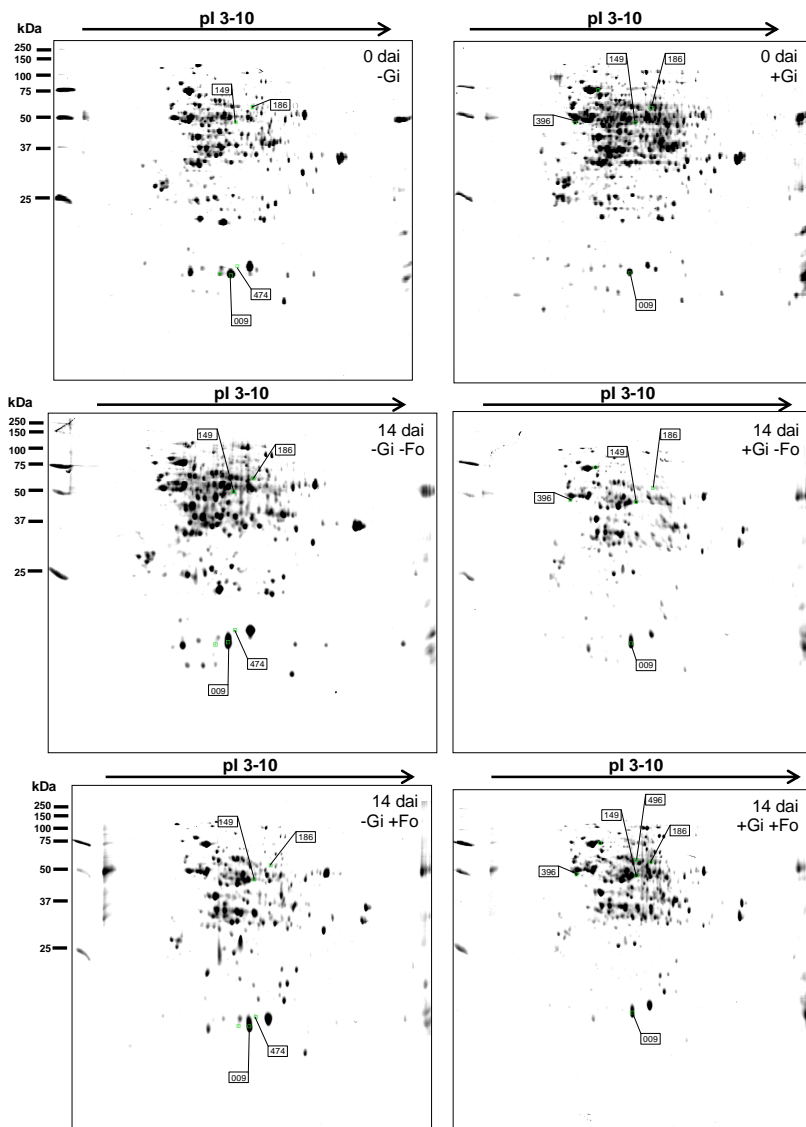


Figura 17. Perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 inoculadas com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Fo) e amostradas no momento (0 dai) e aos 14 dias após a inoculação do patógeno (14 dai). Números indicam proteínas apresentadas nas Figuras 18, 19 e 20.

Comparado ao efeito da formação de micorrizas (Tabela 5) ou pela combinação de inoculação de microrganismos (Tabela 6), *Fusarium* spp., isoladamente, regulou o menor número de proteínas. De fato, a associação micorrízica, independente da inoculação do patógeno, modificou o nível basal de expressão de 10 proteínas e promoveu a indução de 11 bandas de proteínas; outras três bandas foram expressas somente em plantas não micorrizadas (Tabela 5). Os níveis basais das bandas de proteínas NIs 149 (Figura 18), 132, 079 e 187 aumentaram em resposta à micorrização e o nível de expressão diminuiu nas bandas NIs 092, 146, 175, 037, 014 e 013. Exemplos de bandas induzida (NI 396) e reprimida (NI 474) no sistema radicular de videiras micorrizadas são apresentados na Figura 19.

Videiras micorrizadas apresentaram aumento no nível basal de três proteínas (NIs 104, 186 e 089) e indução de oito bandas de proteínas (NIs 491, 493, 495, 496, 497, 500, 502, 503) em resposta à inoculação do patógeno (Tabela 6). A banda NI 015 teve aumento no nível de expressão em plantas não micorrizadas e inoculadas com *Fusarium* spp. Curiosamente, uma proteína (NI 102) foi reprimida no sistema radicular de videiras micorrizadas submetidas à inoculação do patógeno. Além disso, três das proteínas relacionadas à simbiose mutualística (NIs 391, 395 e 416) tiveram os níveis de expressão aumentados na presença do patógeno (Tabela 5). Na Figura 20 estão representadas bandas de proteínas com aumento no nível basal (NI 186) e sintetizada (NI 496) no tratamento +Gi +Fo.

Alterações significativas (Newman-Keuls, $P \geq 0,05$) no nível basal de outras 30 bandas de proteínas foram observadas (Anexo A), mas não foram consideradas porque as razões entre volumes relativos das bandas de proteínas dos tratamentos e respectivos controles foram menores que dois ou superior a 0,5.

Tabela 5. Número de identificação (NI), ponto isoeétrico (pI), massa molecular (MM) e volume relativo (%) de bandas de proteínas do sistema radicular de videiras reguladas pela formação de micorrizas. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemanitis* (Fo) e amostradas no momento da inoculação (0 dai) e aos 14 dias (14 dai) após a inoculação do patógeno.

NI	pI	MM	0 dai		P ^(a)		14 dai		P ^(a)		P ^(b)	
			-Gi	+Gi	-Gi	+Gi	-Gi	+Gi	-Gi	+Gi	-Gi	+Gi
149	6,2	46	0,14	0,47	*		0,19	0,69	0,09	0,74	****	ns
132	6,7	42	0,25	0,33	ns		0,13	0,22	0,06	0,39	**	ns
079	6,1	32	0,33	0,28	ns		0,15	0,49	0,23	0,62	**	ns
187	6,2	55	0,33	0,68	*		0,30	0,69	0,39	1,03	**	ns
092	5,8	33	1,10	0,36	**		1,03	0,62	0,91	0,35	****	ns
146	5,0	46	0,07	0,13	ns		0,18	0,05	0,12	0,07	*	ns
175	4,9	54	0,07	0,13	ns		0,15	0,04	0,12	0,06	*	ns
037	5,6	25	0,25	0,21	ns		0,35	0,06	0,16	0,11	*	ns
014	5,9	15	0,24	0,13	*		0,15	0,06	0,17	0,04	*	ns
013	5,5	14	0,09	0,08	ns		0,21	0,05	0,14	0,05	**	ns
391	6,8	35	0	0,11			0	0,04	0	0,27	**	I
395	6,4	44	0	0,18			0	0,01	0	0,19	**	I
416	7,0	45	0	0,10			0	0,09	0	0,43	**	I

NI	pI	MM	0 dai		P ^(a)		14 dai		P ^(a)				P ^(b)	
			-Gi	+Gi	-Gi	+Gi	-Gi -Fo	+Gi -Fo	-Gi +Fo	+Gi +Fo	Gi	Fo	Gi x Fo	mudança
433	5,5	49	0	0,16			0	0,05	0	0,19		ns		I
413	5,4	48	0	0,28			0	0,17	0	0,08		ns		I
410	4,5	25	0	0,44			0	0,11	0	0,20		ns		I
427	9,8	12	0	0,10			0	0,07	0	0,05		ns		I
431	5,5	32	0	0,20			0	0,35	0	0,41		ns		I
404	5,7	76	0	0,10			0	0,06	0	0,07		ns		I
402	5,4	73	0	0,68			0	0,83	0	0,80		ns		I
396	4,8	48	0	0,38			0	0,29	0	0,28		ns		I
473	5,9	14	0,11	0			0,09	0	0,05	0		ns		R
474	6,3	15	0,01	0			0,06	0	0,22	0		ns		R
475	5,5	53	0,14	0			0,16	0	0,22	0		ns		R

^(a) Probabilidade, de acordo com teste F, para as causas de variação Gi, Fo ou Gi x Fo em cada amostragem (0 e 14 dai); n=6.
* P≥0,05; ** P≥0,01; *** P≥0,001; ns, não significativo.
^(b) "+", "-" e "+,+" simbolizam aumento e diminuição no nível de expressão de bandas de proteínas em plantas micorrizadas, respectivamente; I – bandas de proteínas induzidas por micorrizas; R – bandas de proteínas reprimidas em plantas micorrizadas.

Tabela 6. Número de identificação (NI), ponto isoeletrico (pI), massa molecular (MM) e volume relativo (%) de bandas de proteínas do sistema radicular de videiras reguladas pela formação de micorrizas e infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemanotis*. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium* spp. (Fo) e amostradas no momento da inoculação (0 dai) e aos 14 dias (14 dai) após a inoculação do patógeno.

NI	pI	MM	0 dai		P ^(a)		14 dai				P ^(a)			mudança ^(b)
			-Gi	+Gi	-Gi	+Gi	-Gi -Fo	+Gi -Fo	-Gi +Fo	+Gi +Fo	Gi	Fo	Gi x Fo	
104	6,5	36	0,21	0,64	**		0,35 b	0,42 b	0,16 b	0,83 a	**	ns	*	+
186	6,5	56	0,26	0,18	ns		0,19 b	0,19 b	0,11 b	0,37 a	*	ns	*	+
089	7,0	33	0,16	0,25	ns		0,19 b	0,14 b	0,14 b	0,34 a	ns	ns	*	+
015	6,5	15	3,69	0,74	*		2,98 b	2,89 b	6,93 a	2,85 b	*	*	*	++
491	6,8	46	0	0			0	0	0	0,25				I
493	6,3	65	0	0			0	0	0	0,05				I
495	6,7	36	0	0			0	0	0	0,07				I
496	6,2	57	0	0			0	0	0	0,15				I
497	6,3	81	0	0			0	0	0	0,08				I
500	5,6	52	0	0			0	0	0	0,17				I
502	5,7	36	0	0			0	0	0	0,19				I
503	5,7	53	0	0			0	0	0	0,23				I
102	6	35	0,23	0,14			0,11	0,13	0,2	0				R

^(a) Probabilidade, de acordo com teste F, para as causas de variação Gi, Fo ou Gi x Fo em cada amostragem (0 e 14 dai) ; n=6.

* $P \geq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ns, não significativo.

^(b) médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls ($P \leq 0,05$; n=6).

^(c) "+,+" e "+,++" simbolizam aumento no nível de expressão de bandas de proteínas nos tratamentos +Gi+Fo e -Gi+Fo, respectivamente, em relação aos demais tratamentos; I – bandas de proteínas induzidas por micorrizas após inoculação do patógeno; R – bandas de proteínas reprimidas no tratamento +Gi+Fo.

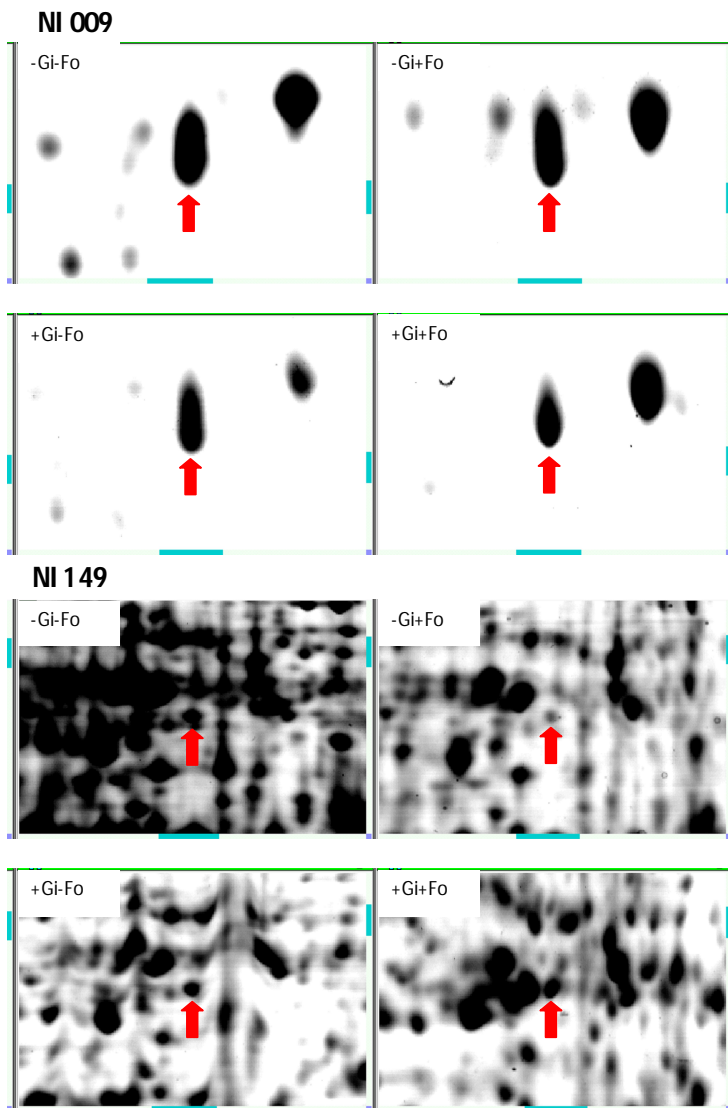


Figura 18. Bandas de proteínas com diminuição e aumento no nível de expressão (NIs 009 e 149, respectivamente) em amostras radiculares de videiras micorrizadas. Mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Fo) e amostradas aos 14 dias após a inoculação do patógeno.

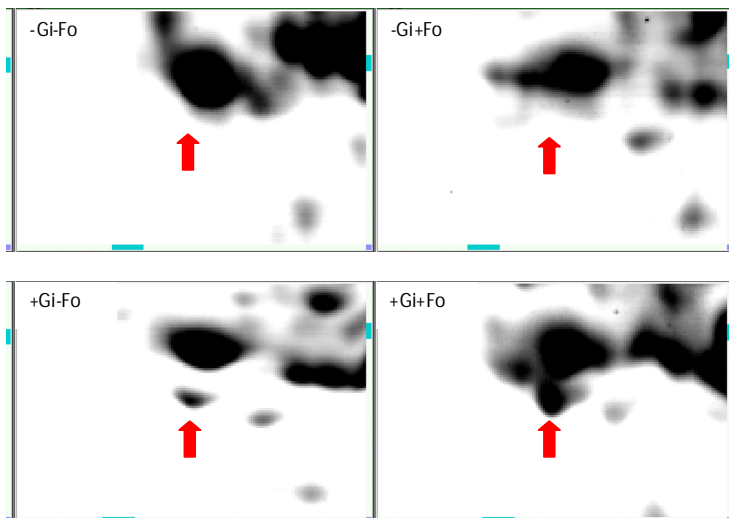
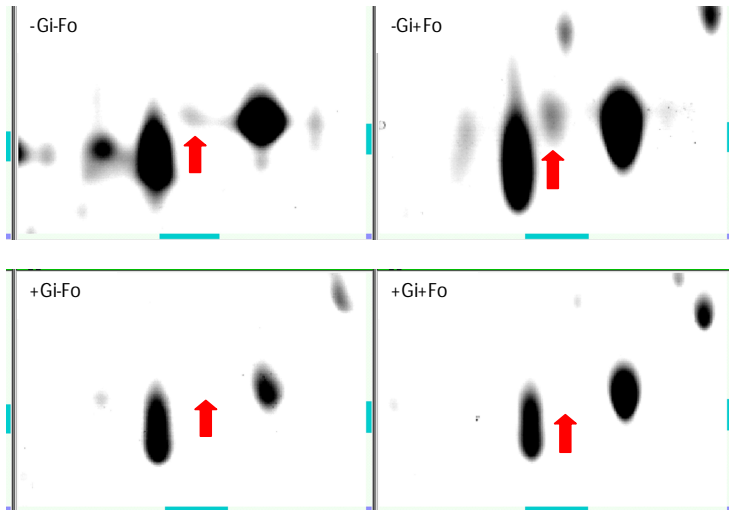
NI 396**NI 474**

Figura 19. Bandas de proteínas induzidas (NI 396) e reprimidas (NI 474) em amostras radiculares de videiras micorrizadas. Mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Fo) e amostradas aos 14 dias após a inoculação do patógeno.

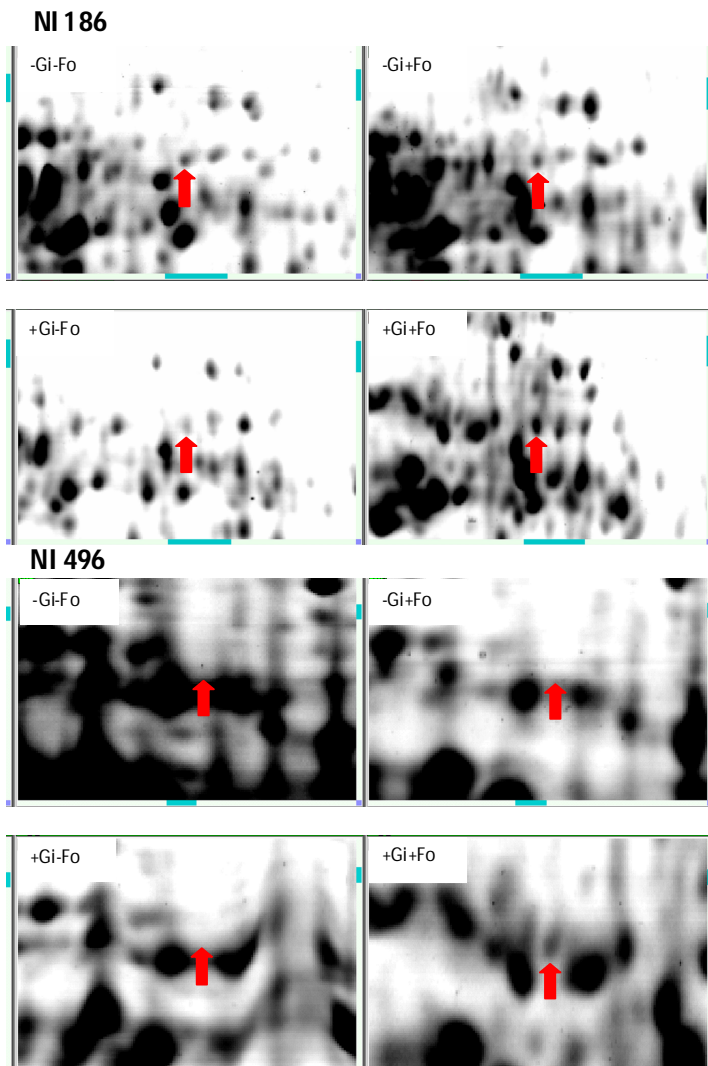


Figura 20. Banda de proteína com aumento no nível de expressão em amostras radiculares de videiras micorrizadas e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (NI 186) e banda de proteína induzida pelo patógeno em amostras radiculares de videiras micorrizadas (NI 496). Mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium* spp. (Fo) e amostradas aos 14 dias após a inoculação do patógeno.

2.4. Sintomas externos e internos de ataque por *Fusarium* spp.

Mudas de videiras micorrizadas com *G. intraradices* apresentaram diminuição de sintomas externos e internos de *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis* 90 dias após a inoculação (Tabela 7). A taxa de colonização micorrízica (M%) atingiu nível superior ao mínimo (acima de 50%) constatado no patossistema tomateiro - *Phytophthora parasitica* para ocorrência de efeito supressivo por micorrizas (CORDIER et al., 1998).

O decréscimo na biomassa vegetal causado por *Fusarium* spp. nas plantas micorrizadas foi de 37%, valor acima aos observados nas interações entre feijoeiros micorrizados e *Fusarium phaseoli* (DAR et al., 1997), que foi de 14%. Plantas não micorrizadas e inoculadas com o patógeno tiveram a biomassa diminuída pela metade em comparação ao respectivo controle, embora não tenha se observado diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 7. Índice de doença de sintomas internos e externos, biomassa seca (g), taxa de colonização do córtex radicular (M%) e concentração de arbúsculos na fração radicular micorrizada (a%) de mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Fo). Avaliação foi realizada 90 dias após a inoculação do patógeno.

tratamentos	Índice de doença ^(a)		Biomassa seca total (g) ^(a)	M% ^(a)	a% ^(a)
	sintomas internos	sintomas externos			
+Gi +Fo	3,2 ± 0,2 b	2,9 ± 0,4 b	1,52 ± 0,10 b	77 ± 2	63 ± 8
-Gi +Fo	4,0 ± 0,3 a	4,0 ± 0,3 a	0,22 ± 0,04 c	0 ± 0	0 ± 0
+Gi -Fo	1,0 ± 0,0 c	1,0 ± 0,0 c	2,41 ± 0,21 a	66 ± 5	63 ± 9
-Gi -Fo	1,0 ± 0,0 c	1,0 ± 0,0 c	0,45 ± 0,06 c	0 ± 0	0 ± 0
C.V. ^(b)	0,26	0,33	0,34	0,28	0,55
----- P (teste F) -----					
Gi	0,022	0,010	0,000	0,000	0,000
Fo	0,000	0,000	0,000	0,049	0,835
Gi x Fo	0,029	0,011	0,004	0,060	0,621

^(a) média ± erro-padrão; médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Newman-Keuls ($P \leq 0,05$; n = 10).

^(b) coeficiente de variação.

3. Discussão

A inoculação de *Glomus intraradices* no porta-enxerto de videira SO4 promoveu alterações no crescimento e na alocação de fotossintatos e nutrientes na parte aérea e no sistema radicular. A razão entre massa acumulada no sistema radicular e na parte aérea (SR/PA), maior em plantas não micorrizadas (Figura 14), vai ao encontro de resultados constatados em outras espécies, sejam anuais ou perenes (PÉREZ & URCELAY, 2009; COPETTA et al., 2006; VAAST et al., 1996; RUIZ-LOZANO et al., 1995; HUANTE et al., 1993) e em genótipos de videira (MOTOSUGI et al., 2002). A inoculação de *G. intraradices* em mudas micropropagadas de *Prunus cerasifera*, além dos efeitos positivos no acúmulo de biomassa, teve mesmo efeito na SR/PA constatado nas mudas de videira (BERTA et al., 1995). Estruturas do fungo têm maior eficiência energética na absorção de nutrientes e água que os tecidos radiculares (SMITH & READ, 2008). O menor custo para a manutenção das estruturas fúngicas - nas quais se incluem as hifas extrarradiculares responsáveis pela absorção de nutrientes - em plantas micorrizadas permite a realocação de fotossintatos e maior crescimento da parte aérea. A diminuição no acúmulo relativo de biomassa radicular representa, assim, a economia de carbono feito pela planta e mostra que micorrizas funcionais são órgãos de absorção de maior eficiência que raízes.

As concentrações e as eficiências micorrízicas na absorção de fósforo e potássio (Tabela 2) atingiram valores semelhantes a outros trabalhos envolvendo inoculação de FMA em videiras (NIKOLAOU et al., 2003; KARAGIANNIDIS et al., 2007). Plantas não micorrizadas, por outro lado, tiveram maiores concentrações de ferro, manganês e boro na parte aérea. Níveis de boro superiores (KARAGIANNIDIS et al., 2007) e inferiores (BIRICOLTI et al., 1997) foram constatados em videiras micorrizadas; outros trabalhos não encontraram efeitos na concentração de boro em tecidos foliares (KARAGIANNIDIS & NIKOLAOU, 2000; BAVARESCO & FOGHER, 1996b), indicando que esse efeito não é muito claro e talvez dependa da interação entre genótipo de porta-enxerto, espécie de FMA e condições de solo ou substrato.

Maior acúmulo de manganês em tecidos foliares em plantas não micorrizadas também foi registrado por Karagiannidis et al. (2007) e Biricolti et al. (1997), mas os autores não apresentaram uma razão plausível para os resultados. De acordo com o trabalho de Nogueira & Cardoso (2003), a disponibilidade de manganês no substrato determina a dinâmica de absorção desse elemento em plantas micorrizadas. Em solos arenosos, a concentração de manganês na parte aérea e sistema radicular

da soja foi maior em plantas não micorrizadas, enquanto o contrário foi observado em solos argilosos. Em outro estudo de Nogueira & Cardoso (2002), plantas de soja micorrizadas apresentaram teores menores de manganês, atribuídos à diminuição da disponibilidade do elemento no substrato. Esse efeito, de acordo com Kothari et al. (1991) e Posta et al. (1994), é derivado de mudanças na exsudação radicular de compostos solubilizadores de manganês e da regulação qualitativa da população microbiana pela associação micorrízica. Na rizosfera do milho, a proporção de microrganismos redutores de manganês na microbiota foi de cinco vezes (POSTA et al., 1994) e de até 20 a 30 vezes (KOTHARI et al., 1991) menor em plantas micorrizadas. Os autores observaram mesmo efeito na população de redutores de ferro, o que explicaria os resultados maiores do elemento na parte aérea das videiras não micorrizadas (Tabela 2).

A melhora no status nutricional pode ter contribuído à diminuição dos sintomas de infecção por *Fusarium* spp. nas plantas micorrizadas (Tabela 7), pelo aumento da tolerância e compensação dos danos causados pelo processo infectivo do patógeno (AZCÓN-AGUILAR et al., 2002). A melhora na nutrição em fósforo e o aumento no crescimento do hospedeiro vegetal foi um dos fatores relacionados ao efeito supressivo e à diminuição nos sintomas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomateiros micorrizados com *G. intraradices* (AKKOPRU & DEMIR, 2005). Da mesma forma, Dar et al. (1997) associaram a diminuição da podridão radicular de *F. solani* em feijoeiros à melhora no crescimento e no aporte de fósforo e nitrogênio pelas simbioses entre o hospedeiro vegetal com *Glomus mosseae* e *Rhizobium leguminosarum*. A melhora no status nutricional, como mostram esses trabalhos e como tem sido proposto por revisões sobre assunto, pode ter contribuído à diminuição na severidade de *Fusarium* spp. no porta-enxerto de videira. A maior absorção e concentração de fósforo e potássio aumentaram o vigor nas plantas micorrizadas e melhoraram o equilíbrio nutricional, permitindo respostas de forma mais rápida ou compensando os danos pela presença do patógeno.

A elevação conjunta de quitinases e β -1,3-glucanases pode representar a ativação de mecanismo de defesa de natureza bioquímica que pode ter contribuído ao atraso do processo de infecção de *Fusarium* spp. em videiras micorrizadas (Figura 16). Quitinases e β -1,3-glucanases são proteínas relacionadas à patogênese, induzidas por microorganismos patogênicos ou não (VAN LOON et al., 2006); a atividade inibidora do crescimento de espécies de *Fusarium* foi avaliada e constatada em en-

saio *in vitro* e ocorre pela lise das extremidades das hifas (MAUCH et al., 1988; NÓBREGA, et al., 2005). Trabalhos demonstram que a inoculação de FMA induz isoformas específicas de quitinases e glucanases, diferentes das presentes em níveis basais (DUMAS-GAUDOT et al., 1996; POZO et al., 2002a). Indo além, em tomateiros micorrizados e/ou inoculados com *P. parasitica*, a análise eletroforética da atividade de quitinases e β -1,3-glucanases em amostras radiculares permitiu constatar mais três tipos de expressões: micorrizas elevaram a expressão de isoformas acima do nível basal; o patógeno induziu a expressão de isoformas específicas; plantas micorrizadas e inoculada com o patógeno expressaram isoformas diversas das demais (POZO et al., 1998; POZO et al., 1999; POZO et al., 2002a). Também é possível que patógenos aumentem o nível de expressão de determinadas isoformas (DASSI et al., 1996). Esses e outros trabalhos avaliaram a expressão de proteínas relacionadas à patogênese em interações entre plantas, FMA e patógenos utilizando técnicas de eletroforese e comparação de perfis enzimáticos (DASSI et al., 1998; POZO et al., 1999; POZO et al., 2002a; GARMENDIA et al., 2006). Nesse tipo de análise, a visualização de bandas de proteínas permite avaliar a atividade enzimática de forma qualitativa, pela separação de isoformas com diferentes massas moleculares, e de forma quantitativa, pela intensidade das bandas protéicas. Por outro lado, a estimativa de atividade hidrolítica de quitinases, com o uso de substrato enzimático, limita-se à informação quantitativa.

As formas distintas indicam que as enzimas induzidas por micorrizas ou patógenos possuem funções específicas para cada caso. Nesse sentido, a classificação das enzimas pela natureza catalítica não necessariamente representa a função metabólica – nesse caso, regulação da simbiose mutualística e supressão de patógenos. É importante destacar que, segundo o entendimento atual, isoformas de quitinases e β -1,3-glucanases induzidas por micorrizas possuem origem vegetal, pois elas variaram em massa e características de acordo com a espécie de planta e não com a espécie de FMA (DUMAS-GAUDOT et al., 1992) e extratos protéicos de micélio de FMA não apresentaram atividade de β -1,3-glucanases (POZO et al., 1999). Trabalhos revisados por Dumas-Gaudot et al. (1996) mostram que a superexpressão de genes de quitinases em plantas transgênicas promoveu controle efetivo de patógenos inoculados e não interferiu no desenvolvimento de micorrizas. A produção de quitinases nas plantas micorrizadas e/ou inoculadas com *Fusarium* spp., dessa forma, seria uma resposta à presença dos microssimbiontes, mas com função diversa para cada situação.

Como foi descrito anteriormente, os níveis de expressão de proteínas relacionadas à patogênese são mais elevados nos estágios iniciais de estabelecimento de micorrizas, seguindo-se de decréscimo gradual (GIANINAZZI-PEARSON et al., 1996a). Essas enzimas podem estar relacionadas ao processo de supressão das defesas da planta, pela clivagem de elicitores de origem fúngica, permitindo a acomodação do simbiote (SALZER et al., 2000). A produção transiente de quitinases e β -1,3-glucanases não explicariam os níveis superiores de atividade da primeira enzima nas videiras do tratamento +Gi -Fo. Entretanto, tomateiros micorrizados expressaram uma isoforma de quitinases que foi detectada durante oito semanas, mas com diminuição gradativa da intensidade da banda (POZO et al., 1998). Por essa conclusão, sugere-se que o nível de atividade da enzima nas videiras micorrizadas manteve-se quantitativamente até 45 dias após a segunda inoculação de *G. intraradices*, o que poderia explicar os níveis de atividade de quitinases das plantas +Gi -Fo em magnitude semelhante aos tratamentos com inoculação de *Fusarium* spp. As condições de fertilidade do solo também podem ter regulado a atividade de quitinases no sistema radicular, que atuam na restrição do crescimento intrarradicular do fungo quando há alta concentração de fósforo no solo (LAMBAIS & MEHDY, 1998).

A expressão de β -1,3-glucanases acima dos níveis basais não foi observada nas plantas micorrizadas não inoculadas com o patógeno (Figura 16). Em tomateiro, Pozo et al. (1999) detectaram duas isoformas ácidas de β -1,3-glucanases induzidas somente pela colonização radicular por *G. mosseae*, fato não observado pela inoculação com *G. intraradices*. Essas isoformas se apresentaram independente da inoculação do patógeno, sugerindo que elas possuem função no desenvolvimento da simbiose mutualística pela degradação de β -1,3-glucanas das hifas intrarradiculares (POZO et al., 1999).

A inoculação de *Fusarium* spp. nas plantas não micorrizadas induziu a expressão de quitinases, fato não observado para a outra enzima (Figura 16). Nas videiras micorrizadas e inoculadas com *Fusarium* spp., os níveis superiores de atividade de quitinases e β -1,3-glucanases podem representar a indução de isoformas de ação específica na supressão do patógeno. Dumas-Gaudot et al. (1996) sugerem que as isoformas de quitinases induzidas por micorrizas promovem liberação de elicitores, a partir de oligossacarídeos da quitina presente nas paredes celulares do fungo, o que estimularia respostas de defesa das plantas contra patógenos. Após inoculação de *P. parasitica* em tomateiros, Pozo et al. (1999) constataram a expressão de duas isoformas básicas de β -1,3-glucanases

induzidas por micorrizas, sugerindo que essas enzimas estariam relacionadas à proteção contra o fungo patogênico. A indução na expressão de proteínas relacionadas à patogênese por micorrizas foi associada ao controle de *Verticillium dahliae*, patógeno causador de murcha vascular em pimenteiras (GARMENDIA et al., 2006). O trabalho de Slezack et al. (2000) mostrou que ervilhas inoculadas com *G. mosseae* apresentaram diminuição da incidência de *Aphanomyces euteiches*, fato associado à expressão de isoformas de quitinases por micorrizas.

Em ensaios *in vitro*, Mauch et al. (1988) constataram efeito sinérgico entre quitinases e β -1,3-glucanases, de maneira que cada enzima não inibiu, individualmente, o crescimento da maioria dos fungos testados. Níveis elevados de atividade dessas duas enzimas foram observados somente no tratamento +Gi+Fo, tratamento que apresentou diminuição nos sintomas internos de infecção por *Fusarium* spp. Conforme o trabalho dos autores acima, isso é um indicativo de que a produção pós-infeccional das duas proteínas relacionadas à patogênese teve um efeito sinérgico capaz de suprimir ou atrasar a evolução das doenças nas plantas micorrizadas. Em folhas de cafeeiro, o aumento da atividade de quitinases e β -1,3-glucanases e a indução de duas isoformas de β -1,3-glucanases por *Bacillus thuringiensis* estiveram relacionadas com a resistência ao patógeno *Hemileia vastatrix* (GUZZO & MARTINS, 1996). Outros trabalhos mostram, em combinações diferenciadas de patógeno e hospedeiro vegetal, que há relação entre os níveis de atividade hidrolítica dessas enzimas, estimadas por meio de substratos específicos, e a expressão de isoformas, obtidas em géis de eletroforese (EGEA et al., 1999; CACHINERO et al., 2002).

É importante salientar que a interação entre as espécies de simbiontes envolvidos pode ser determinante no sucesso da bioproteção contra patógenos radiculares. Em um mesmo hospedeiro vegetal, espécies de FMA tiveram efeitos contrastantes na supressão de patógeno. Curiosamente, a inoculação de *G. intraradices*, espécie utilizada neste trabalho, não teve efeito de bioproteção de tomateiros contra *Phytophthora parasitica*, sendo que o contrário foi observado nas plantas micorrizadas com *G. mosseae* (POZO et al., 2002a; POZO et al., 1999). Os autores sugerem que a indução na expressão de enzimas por espécies de FMA depende da interação com o hospedeiro vegetal, o que dificulta uma conclusão definitiva sobre a regulação da expressão de β -1,3-glucanases em micorrizas. O papel de proteínas relacionadas à patogênese, onde se incluem quitinases e β -1,3-glucanases, na supressão de patógenos em plantas micorrizadas é controverso e motivo de discussão mais ampla.

Dassi et al. (1998) concluíram que a expressão dessas proteínas, embora constitua uma resposta à presença do patógeno, não está envolvida diretamente na defesa de tomates micorrizados contra *P. parasitica*.

O acúmulo pós-infeccional de proteínas relacionadas à patogênese no sistema radicular das plantas não significa sucesso na supressão de patógenos. As videiras não micorrizadas apresentaram níveis superiores de atividade de quitinases após a inoculação do patógeno, o que não evitou o processo infectivo. A produção dessa enzima, em resposta à presença de patógenos, representa uma estratégia de defesa de plantas que, de acordo com o genótipo do hospedeiro vegetal, nível de resistência varietal e espécie ou virulência do patógeno, podem ser superadas e permitir o avanço do simbionte. O que precisa ser esclarecido é se as enzimas induzidas por micorrizas apresentam propriedades diferentes daquelas expressas em níveis basais e/ou induzidas por patógenos. Também precisa ser investigado qual é a participação das proteínas relacionadas à patogênese como ação direta – pela clivagem de constituintes da parede celular de patógenos – ou indireta – como sinal bioquímico para indução de outros mecanismos de defesa – nas respostas de defesa e supressão do progresso das doenças radiculares.

Em resumo, a indução local de quitinases e β -1,3-glucanases acima dos níveis basais pode ter contribuído com a diminuição da infecção por *Fusarium* spp em plantas micorrizadas. Esse resultado indica que ocorreu a expressão de genes em resposta à presença do patógeno no sistema radicular, constituindo assim barreira química ao processo infectivo e/ou servindo de sinais bioquímicos para a expressão de outros eventos relacionados à defesa da planta. Dessa forma, a indução na expressão dessas duas proteínas relacionadas à patogênese pode estar relacionada à diminuição dos sintomas de presença de *Fusarium* sp. avaliada aos 90 dai (Tabela 7). Cabe salientar que nas videiras micorrizadas, a expressão das enzimas hidrolíticas não evitou, mas diminuiu o processo de infecção pelo patógeno. Pode ter contribuído para os resultados o fato de se ter feito poda do sistema radicular na inoculação de *Fusarium* spp., o que expôs os tecidos internos, e aumentou a quantidade de pontos infectivos, facilitando a invasão pelo patógeno. Nos trabalhos consultados, patógenos são inoculados nas plantas pela adição de suspensão de estruturas reprodutivas no substrato de crescimento das plantas, próximo ao sistema radicular, sem retirada e corte de tecidos (AKKÖPRÜ & DEMIR, 2005; POZO et al., 2002a; POZO et al., 1999). Poda de raízes pode ser condição drástica e propensa à colonização patogênica, embora tenha sido o método mais eficiente na avaliação rápida da resistência de genótipos de videira ao patógeno (GRIGOLETTI JR., 1985).

Os resultados dos perfis protéicos mostraram mudanças no nível de expressão e a indução de proteínas pela micorriza (Tabelas 5 e 6), que podem estar relacionado à regulação da simbiose e à supressão de *Fusarium* spp. no sistema radicular do porta-enxerto de videira SO4.

Em *M. truncatula*, o monitoramento do proteoma do sistema radicular entre dois e 42 dias após a inoculação do fungo micorrízico *G. mosseae* apresentou a indução de um total de 41 proteínas; aos 42 dias após a inoculação, com a formação de micorriza funcional, manteve-se a indução de 12 proteínas relacionadas à simbiose (BESTEL-CORRE et al., 2002). Essas proteínas relacionadas à simbiose atuam no funcionamento e manutenção da associação micorrízica: a análise em espectrômetro de massa das bandas indicou homologia com proteínas do metabolismo vegetal envolvidas em respostas de defesa, como glutatona transferase; envolvidas na fisiologia radicular, como miosina, componente do citoesqueleto de células; e relacionadas com a rota respiratória, como uma serina hidroximetil-transferase (BESTEL-CORRE et al., 2002).

A quantidade constatada por esses autores é semelhante à observada neste trabalho, que verificou a expressão de 11 novas proteínas em videiras com micorrizas funcionais (Tabela 5). As proteínas se concentraram na faixa de *pI* entre 4,5 e 5,7 e uma dessas proteínas induzidas apresentou valor de *pI* igual a 9,8 (BESTEL-CORRE et al., 2002), semelhante a banda de proteína de NI 427 (Tabela 5). A comparação com o trabalho de Bestel-Corre et al. (2002) mostra a semelhança entre o *pI* da banda NI 391 com uma proteína que apresentou homologia a serina hidroximetil-transferase, uma enzima do componente mitocondrial da rota fotorrespiratória, catalisadora da conversão de serina a glicina (BESTEL-CORRE et al., 2002). Outra banda de proteína (NI 410) apresentou valores de *pI* igual a 4,5 e massa molecular de 25 kDa, valores semelhantes a proteína com homologia citocromo-c-oxidase subunidade 6b, outra enzima envolvida com a cadeia respiratória, induzida por micorriza em *M. truncatula*.

Alterações nos níveis de expressão e a síntese específica de proteínas foram observadas no patossistema *Medicago truncatula* - *Aphanomyces euteiches* (COLDITZ et al. 2004). Esses autores constataram modificações na expressão de 16 proteínas aos 14 dias de inoculação do patógeno das quais cinco foram inibidas, duas foram induzidas e nove aumentaram o nível de expressão nas raízes infectadas. A maioria das proteínas com aumento na expressão em raízes infectadas mostrou similaridade com membros da família de proteínas relacionadas à patogênese do tipo PR-10. A função precisa dessas proteínas, que são estrutural-

mente relacionadas a ribonucleases, continua pouco claro (COLDITZ et al., 2004). Essa proteína também acumulou em raízes de videira submetidas a estresse químico pelo herbicida flumioxazin (CASTRO et al., 2005) e a estresse salino (JELLOULI et al., 2008). Em relação às proteínas induzidas, Colditz et al. (2004) identificaram a proteína pi 49 de resposta de resistência à doença, previamente identificada em *Pisum sativum*, e uma proteína de choque térmico classe I de 18,2 kDa.

Em outro trabalho utilizando a interação entre *Medicago truncatula* e *Aphanomyces euteiches* (COLDITZ et al., 2005), plantas micorrizadas com *Glomus intraradices* tiveram redução dos sintomas de ataque do patógeno. Essa espécie de fungo micorrízico vem sendo avaliada em trabalhos de proteômica no Centro de Pesquisa do INRA de Dijon, França, e é uma das principais espécies utilizada em estudos relacionados ao biocontrole de patógenos radiculares (POZO et al., 1999; 2002a). Na comparação entre plantas não micorrizadas de três linhagens da espécie vegetal, Colditz et al. (2005) constataram resultados semelhantes a trabalho anterior (COLDITZ et al., 2004), com aumento significativo na expressão de proteínas do tipo PR-10 na linhagem suscetível ao patógeno após inoculação deste. Por outro lado, após a inoculação de *A. euteiches*, a expressão de PR-10 teve o nível reduzido em plantas micorrizadas em comparação às plantas não micorrizadas (COLDITZ et al., 2005). Plantas micorrizadas e inoculadas com o patógeno apresentaram aumento na expressão de duas enzimas da rota de fenilpropanóides (chalcone metiltransferase e chalcone redutase) três vezes mais em relação a plantas micorrizadas e duas vezes maior em relação a plantas somente inoculadas com o patógeno. Os autores sugerem que a formação de micorriza promoveu a síntese e acúmulo dessas proteínas nas raízes que serviu de proteção pré-estabelecida contra o patógeno após a inoculação deste (COLDITZ et al., 2005). As informações são limitadas em relação à comparação de perfis protéicos do sistema radicular em interações com patógenos, em especial na proteômica de interações entre plantas, FMA e microorganismos parasíticos, que está restrito ao trabalho de Colditz et al. (2005).

Do ponto de vista metodológico, a boa resolução de bandas indica que a extração fenólica pode ser usada rotineiramente na extração de proteínas do sistema radicular de videiras. De fato, a extração fenólica tem se mostrado viável na obtenção de proteínas para subsequente eletroforese de material recalcitrante, pobre em proteínas, rico em compostos interferentes como compostos fenólicos, enzimas proteolíticas, pigmentos e polissacarídeos (SARAVANAN & ROSE, 2004; CARPENTIER et al., 2005). Como desvantagens, esse método é trabalhoso, de-

manda tempo considerável e apresenta riscos à saúde devido à manipulação de fenol. A quantidade de bandas foi semelhante à obtida em trabalhos com extratos radiculares de *Medicago truncatula*, planta-modelo em estudos com proteômica na interação com simbiontes (BESTEL-CORRE et al., 2002; COLDITZ et al., 2004), na qual se obteve em torno de 500 bandas pela revelação de proteínas com solução de Coomassie. O número de bandas detectadas neste trabalho foi inferior, por exemplo, ao do trabalho de CASTRO et al. (2005), que constatou 2.000 bandas em amostras radiculares. Entretanto, tais autores utilizaram nitrato de prata para revelação das proteínas, método mais sensível e que permite maior resolução de bandas.

A baixa frequência de diversas bandas reflete a dificuldade de trabalhar com a interação entre três simbiontes e o acúmulo de erros associado aos experimentos, como aspectos inerentes ao material que interferem na concentração de proteínas e a manipulação do material vegetal e perdas durante a extração das proteínas. As condições “semi-controladas” do experimento, em câmara de crescimento, também pode contribuir a esses erros, pois diferem de condições axênicas e otimizadas em cultura *in vitro*; por exemplo, o proteoma de calos embriogênicos de *Vitis vinifera* revelou mais de 1.000 bandas utilizando-se Coomassie como corante (MARSONI et al., 2008), valor praticamente o dobro deste trabalho. As limitações das técnicas de extração de proteínas de amostras radiculares contribuem para a diminuição na quantidade detectada de proteínas após eletroforese. Proteínas hidrofóbicas, de solubilidade baixa, podem se perder durante a extração e proteínas de baixa abundância podem não ser reveladas nos géis bidimensionais (COLDITZ et al., 2004).

De acordo com os resultados, a mudança no perfil de expressão e a indução de proteínas relacionadas à simbiose podem ter contribuído com o aumento na resistência ao processo infectivo de *Fusarium* spp. em plantas micorrizadas, constatadas na avaliação dos sintomas após 90 dias de inoculação do patógeno. Além disso, a elevação dos níveis de enzimas hidrolíticas, aos 4 dai, indica que a formação da simbiose mutualística promoveu a ativação de barreiras bioquímicas frente ao avanço do patógeno, indicando um efeito de bioproteção por micorrizas.

CONCLUSÕES

1. As atividades de quitinases e β -1,3-glucanases em raízes de videira R110 atingiram os níveis mais altos quatro dias após a inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*.
2. A síntese e acúmulo transiente de quitinases e β -1,3-glucanases em raízes de porta-enxerto resistente a *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis* estão associadas à supressão do processo infectivo do patógeno.
3. A associação micorrízica regulou respostas de defesa à *Fusarium* spp. e promoveu atraso no processo infectivo do patógeno, concorrendo para isso a melhoria no status nutricional de videiras micorrizadas, o efeito sinérgico da atividade hidrolítica de quitinases e β -1,3-glucanases, e também a expressão diferenciada e síntese de novas proteínas em plantas micorrizadas.
4. A inoculação de fungos micorrízicos constitui estratégia para se melhorar o status nutricional de mudas de videiras e para diminuir a incidência de *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis* nos sistemas de produção, fazendo parte de um conjunto de medidas que levem em conta aspectos de manejo do solo (desenvolvimento de rizosfera supressora de patógenos, por exemplo), uso de recursos genéticos, como genótipos resistentes à doença, e de nutrição vegetal, com níveis equilibrados de nutrientes no solo, em prol do desenvolvimento de micorrizas funcionais.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados de perfis protéicos mostram que em trabalhos futuros, para melhor definição e visualização das bandas, será interessante avaliar o uso de tiras de gel com gradiente de pH imobilizado de faixa mais estreita, particularmente entre pH 4 e 7, uma vez que se concentraram nessa faixa de *pI* mais de 80% das bandas.

Além disso, pode ser avaliado o carregamento da amostra de proteínas por meio de *cup loading*. No *cup loading* a amostra é carregada em recipientes individuais colocados na superfície da tiras de gel já reidratadas, na unidade Ettan-IPGPhor (GE Healthcare) utilizada para focalização isoeletrica (WEISS & GÖRG, 2009). Embora seja mais prático, proteínas de peso molecular alto (>100 kDa), muito alcalinas e hidrofóbicas são carregadas com dificuldade quando se aplica as proteínas no momento da reidratação da tira de gel.

A extração fenólica, que se mostrou satisfatória como método de concentração de proteínas radiculares de videiras para eletroforese bidimensional, pode ser comparada em trabalhos futuros ao método proposto por Wang et al. (2006), que combina precipitação de proteínas por meio de solução de ácido tricloroacético e acetona com a extração fenólica. Além disso, a ampliação dos estudos com proteômica em interações entre plantas, fungos micorrízicos e patógenos radiculares poderá ser feita aplicando-se técnicas de extração de proteínas que permitam aumentar a produtividade de proteínas da membrana plasmática e/ou periarbuscular de tecidos radiculares (VALOT et al., 2005), pois nessa interface ocorre o reconhecimento de sinais moleculares importantes de interações entre plantas e microrganismos. Também pode-se empregar técnicas para extração de proteínas e RNA na mesma amostra (DUMAS-GAUDOT et al., 2004b), no sentido de comparar perfis do proteoma e transcriptoma.

O uso de um sistema com divisão do sistema radicular em compartimentos distintos poderá ser usado para avaliar o papel de micorrizas na expressão de genes além da região de contato direto e de sensibilização do sistema radicular por microrganismos e a importância desse evento no fenômeno de indução de resistência sistêmica. Essa estratégia pode também ser usada para estudar rotas de transdução de sinais, em especial aquelas reguladas por ácido jasmônico e ácido salicílico, como mostraram trabalhos revisados nesta tese.

Os resultados de melhora no crescimento e no status nutricional do porta-enxerto de videira SO4 pela uso de inoculante micorrízico

demonstraram que essa biotecnologia pode ser testada em outras espécies micropropagadas, em especial frutíferas perenes. O leque de espécies de FMA pode ser ampliado a outros isolados de eficiência comprovada, ou até mesmo a isolados nativos selecionados nas condições climáticas e edáficas de regiões produtoras de nosso estado.

A proteômica poderá ser utilizada em outros estudos de interações entre videiras e simbiontes mutualístico e parasítico. Estudo recente mostra, por exemplo, o papel da associação micorrízica na diminuição de danos radiculares causados por *Cylindrocarpon macrodidymum* em videira (PETIT & GUBLER, 2006). Esse gênero fúngico é causador da doença chamada de pé-preto, que, semelhante a *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis*, é causador de declínio e morte de videiras, está disseminado no sul do Brasil e não possui forma de controle eficiente (GARRIDO et al., 2004a; GARRIDO et al., 2004b).

Por fim, a avaliação do proteoma de videiras micorrizadas pode ser ampliado a outros porta-enxertos com nível diferenciado de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, como Paulsen 1103 e VR043-43. Assim, pode-se estudar a relação entre a resistência varietal e mudanças no perfil de expressão do genoma, o que pode contribuir para o entendimento das estratégias de defesa de videiras ao patógeno radicular e fornecer informações importantes para os programas de melhoramento da espécie.

REFERÊNCIAS

ACHUO, E. A.; AUDENAERT, K.; MEZIANE, H.; HÖFTE, M. The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 65-72, 2004.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5^a ed. San Diego: Elsevier, 2005. 948 p.

AGUÍN, O.; MANSILLA, J. P.; VILARINO, A.; SAINZ, M. J. Effects of mycorrhizal inoculation on root morphology and nursery production of three grapevine rootstocks. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 55, n. 1, p. 108-111, 2004.

AKKOPRU, A.; DEMIR, S. Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 153, n. 9, p. 544-550, 2005.

ALLEN, E. B.; ALLEN, M. F.; HELM, D. J.; TRAPPE, J. M.; MOLINA, R.; RINCON, E. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, n. 1, p. 47-62, 1995.

ALLEN, M. F. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20th century and a peek into the 21st. **Mycological Research**, New York, v. 100, n. 7, p. 769-782, 1996.

ALOUI, A.; RECORBET, G.; GOLLOTTE, A.; ROBERT, F.; VALOT, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; ASCHI-SMITI, S.; DUMAS-GAUDOT, E. On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A root proteomic study. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 2, p. 420-433, 2009.

AMEY, R. C.; SCHLEICHER, T.; SLINN, J.; LEWIS, M.; MACDONALD, H.; NEILL, S. J.; SPENCER-PHILLIPS, P. T. N. Proteomic analysis of a compatible interaction between *Pisum sativum* (pea) and the downy mildew pathogen *Peronospora viciae*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, n. 1, p. 41-55, 2008.

ANDRADE, E. R. de; SCHUCK, E.; DAL BÓ, M. A. Avaliação da Resistência de *Vitis* spp. a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* em condições controladas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 11, p. 1287-1290, 1993.

ARNESON, P.; DURBIN, R. D. Studies on the mode of action of tomatine as a fungitoxic agent. **Plant Physiology**, Rockville, v. 43, n. 5, p. 683-686, 1968.

ATTWOOD, T. K.; CAMMACK, R.; CAMPBELL, P. N.; PARISH, J. H.; SMITH, A. D.; STIRLING, J. L.; VELLA, F. (Eds.). **Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology**. 2. ed. New York: Oxford University Press Inc., 2006. 738 p.

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, New York, v. 6, n. 6, p. 457-464, 1996.

AZCÓN-AGUILAR, C.; JAIZME-VEGA, M. C.; CALVET, C. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H.; BAREA, J. M.; HASELWANDLER, K. (Eds.). **Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts**. Basel: Birkhäuser, 2002. p. 187-197.

BAAYEN, R. P.; RIJKENBERG, F. H. J. Fine structure of the early interaction of lily roots with *Fusarium oxysporum* f.sp *lilii*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 5, p. 431-443, 1999.

BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; ABUBAKER, J.; JUN, J.; ALLEN, J. W.; BROUILLETTE, J.; DOUDS, D. D.; LAMMERS, P. J.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 1496-1507, 2003.

BALESTRINI, R.; LANFRANCO, L. Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, New York, v. 16, n. 8, p. 509-524, 2006.

BARKER, S. J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 4, p. 1201-1207, 1998.

BARNI, E. J.; VIEIRA, L. M.; SOUZA, A. T. de; BORCHARDT, I.; SCHUCK, Ê.; DELA BRUNA, E.; SANTOS, O. V. dos; SPIES, A. **Potencial de mercado para uva de mesa em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI/CEPA, 2007. 47 p.

BAVARESCO, L.; FOGHER, C. Effect of root infection with *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* on severity of lime-induced chlorosis in *Vitis vinifera* L. cv. 'Pinot Blanc'. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 19, n. 8-9, p. 1319-1329, 1996b.

BAVARESCO, L.; FOGHER, C. Lime-induced chlorosis of grapevine as affected by rootstocks and root infection with arbuscular mycorrhiza and *Pseudomonas fluorescens*. **Vitis**, Siebeldingen, v. 35, n. 3, p. 119-123, 1996a.

BENHAMOU, N.; FORTIN, J. A.; HAMEL, C.; ST-ARNAUD, M; SHATILLA, A. Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 9, p. 958-968, 1994.

BENHAMOU, N.; GRENIER, J.; ASSELIN, A.; LEGRAND, M. Immunogold localization of β -1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. **Plant Cell**, Rockville, v. 1, n. 12, p. 1209-1221, 1989.

BENHAMOU, N.; JOOSTEN, M. H.; DE WIT, P. J. Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, n. 4, p. 1108-1120, 1990.

BERGMÜLLER, E.; BAGINSKY, S.; GRUISSEM, W. Mass spectrometry-based proteomics: identifying plant proteins. In: AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R. (Ed.). **Plant proteomics: technologies, strategies, and applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008. p. 33-45.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A. *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. **Trends in Plant Science**, London, v. 13, n. 3, p. 145-150, 2008.

BERTA, G.; TROTTA, A.; FUSCONI, A.; HOOKER, J. E.; MUNRO, M.; ATKINSON, D.; GIOVANNETTI, M.; MORINI, S.; FORTUNA, P.; TISSERANT, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 15, n. 5, p. 281-293, 1995.

BERTONE, P.; SNYDER, M. Prospects and challenges in proteomics. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, n. 2, p. 560-562, 2005.

BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S. Proteomics as a tool to monitor plant-microbe endosymbioses in the rhizosphere. **Mycorrhiza**, New York, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2004.

BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; POINSOT, V.; DIEU, M.; DIERICK, J. F.; VAN, T. D.; REMACLE, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 23, n. 1, p. 122-37, 2002.

BESTEL-CORRE, G.; GIANINAZZI, S.; DUMAS-GAUDOT, E. Impact of sewage sludges on *Medicago truncatula* symbiotic proteome. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 11, p. 1.651-1.659, 2004.

BIRICOLTI, S.; FERRINI, F.; RINALDELLI, E.; TAMANTINI, I.; VIGNOZZI, N. VAM fungi and soil lime content influence rootstock growth and nutrient content. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 48, n. 1, p. 93-99, 1997.

BOLAN, N. S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 189-207, 1991.

BONANOMI, A.; OETIKER, J. H.; GUGGENHEIM, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; VÖGELI-LANGE, R. Arbuscular mycorrhiza in mini-mycorrhizotrons: first contact of *Medicago truncatula* roots with *Glomus intraradices* induces chalcone synthase. **New Phytologist**, Oxford, v. 150, n. 3, p. 573-582, 2001.

BOOTH, C. The present status of *Fusarium* taxonomy. **Annual Reviews in Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, n. 1, p. 83-93, 1975.

BORGES, A. J. S.; TRINDADE, A. V.; MATOS, A. P.; PEIXOTO, M. F. S. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 35-41, 2007.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 1-2, n. 248-254, 1976.

BRADSHAW, R. A. An introduction to proteomics: applications to plant biology. In: AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R. (Ed.). **Plant proteomics: technologies, strategies, and applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008. p. 1-7.

CACHINERO, J. M.; HERVAS, A.; JIMENEZ-DIAZ, R. M.; TENA, M. Plant defence reactions against fusarium wilt in chickpea induced by incompatible race 0 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonhost isolates of *F. oxysporum*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 6, p. 765-776, 2002.

CAMPRUBÍ, A.; ESTAUN, V.; NOGALES, A.; GARCIA-FIGUERES, F.; PITET, M.; CALVET, C. Response of the grapevine rootstock richter 110 to inoculation with native and selected arbuscular mycorrhizal fungi and growth performance in a replant vineyard. **Mycorrhiza**, New York, v. 18, n. 4, p. 211-216, 2008.

CÁNOVAS, F. M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G.; JORRIN, J.; MOCK, H. P.; ROSSIGNOL, M. Plant proteome analysis. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 2, p. 285-298, 2004.

CARON, M.; FORTIN, J. A.; RICHARD, C. Effect of phosphorus concentration and *Glomus intraradices* on fusarium crown and root-rot of tomatoes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 9, p. 942-946, 1986.

CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 10, p. 2.497-2.507, 2005.

CARUSO, C.; CHILOSI, G.; CAPORALE, C.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. **Plant Science**, Clare, v. 140, n. 1, p. 87-97, 1999.

CASTRO, A. J.; CARAPITO, C.; ZORN, N.; MAGNÉ, C.; LEIZE, E.; VAN DORSSELAER, A.; CLÉMENT, C. Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 421, p. 2.783-2.795, 2005.

CHENG, X. M.; BAUMGARTNER, K. Arbuscular mycorrhizal fungi-mediated nitrogen transfer from vineyard cover crops to grapevines. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 40, n. 6, p. 406-412, 2004.

CHU, E. Y.; ENDO, T.; STEIN, R. L. B.; ALBUQUERQUE, F. C de. Avaliação da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares sobre a incidência da fusariose da pimenta-do-reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 205-208, 1997.

COLDITZ, F.; BRAUN, H.; JACQUET, C.; NIEHAUS, K.; KRAJINSKI, F. Proteomic profiling unravels insights into the molecular background underlying increased *Aphanomyces euteiches*-tolerance of *Medicago truncatula*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 59, n. 3, p. 397-406, 2005.

COLDITZ, F.; KRAJINSKI, F.; NIEHAUS, K. Plant proteomics upon fungal attack. In: ŠAMAJ, J.; THELEN, J. (Ed.). **Plant proteomics**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. p. 283-309.

COLDITZ, F.; NYAMSUREN, O.; NIEHAUS, K.; EUBEL, H.; BRAUN, H. P.; KRAJINSKI, F. Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, n. 1, p. 109-120, 2004.

CONRATH, U.; BECKERS, G. J. M.; FLORS, V.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; NEWMAN, M.-A.; PIETERSE, C. M. J.; POINSSOT, B.; POZO, M. J.; PUGIN, A.; SCHAFFRATH, U.; TON, J.; WENDEHENNE, D.; ZIMMERLI, L.; MAUCH-MANI, B. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, n. 10, p. 1062-1071, 2006.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, n. 5, p. 210-216, 2002.

COPETTA, A.; LINGUA, G.; BERTA, G. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. **Mycorrhiza**, New York, v. 16, n. 7, p. 485-494, 2006.

CORDIER, C.; POZO, M. J.; BAREA, J. M.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 10, p. 1017-1028, 1998.

CRAMPTON, B. G.; HEIN, I.; BERGER, D. K. Salicylic acid confers resistance to a biotrophic rust pathogen, *Puccinia substriata*, in pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 2, p. 291-304, 2009.

CRUZ, A. F.; MARTINS, M. A. Transferência de nitrogênio entre plantas interconectadas por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, n. 4, p. 559-565, 1997.

DAR, G. H.; ZARGAR, M. Y.; BEIGH, G. M. Biocontrol of fusarium root rot in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. **Microbial Ecology**, New York, v. 34, n. 1, p. 74-80, 1997.

DASSI, B.; DUMAS-GAUDOT, E.; ASSELIN, A.; RICHARD, C. GIANINAZZI, S. Chitinase and β -1,3-glucanase isoforms expressed in pea roots inoculated with arbuscular mycorrhizal or pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 102, n. 1, p. 105-108, 1996.

DASSI, B.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S. Do pathogenesis-related (PR) proteins play a role in bioprotection of mycorrhizal tomato roots towards *Phytophthora parasitica*? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 52, n. 3, p. 167-183, 1998.

DI PIETRO, A.; MADRID, M. P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO, M. I. G. Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 315-325, 2003.

DIENER, A. C.; AUSUBEL, F. M. Resistance to FUSARIUM OXYSPORUM 1, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. **Genetics**, Baltimore, v. 171, n. 1, p. 305-321, 2005.

DUGASSA, G. D.; VON ALTEN, H.; SCHÖNBECK, F. Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 185, n.2, p. 173-182, 1996.

DUMAS-GAUDOT, E.; AMIOUR, N.; WEIDMANN, S.; BESTEL-CORRE, G.; VALOT, B.; LENOGUE, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. A technical trick for studying proteomics in parallel to transcriptomics in symbiotic root-fungus interactions. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 2, p. 451-453, 2004b.

DUMAS-GAUDOT, E.; FURLAN, V.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. New acidic chitinase isoforms induced in tobacco roots by vesiculararbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, New York, v. 1, p. 133-136, 1992.

DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G. Proteomes in arbuscular mycorrhizal symbiosis. In: ŠAMAJ, J.; THELEN, J. J. (Ed.). **Plant Proteomics**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. p. 326-345.

DUMAS-GAUDOT, E.; SLEZACK, S.; DASSI, B.; POZO, M. J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Plant hydrolytic enzymes (chitinases and β -1,3-glucanases) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms. **Plant and Soil**, Dordrecht, n. 2, v. 185, p. 211-221, 1996.

DUMAS-GAUDOT, E.; VALOT, B.; BESTEL-CORRE, G.; RECORBET, G.; ST-ARNAUD, M.; FONTAINE, B.; DIEU, M.; RAES, M.; SARAVANAN, R. S.; GIANINAZZI, S. Proteomics as a way to identify extra-radicular fungal proteins from *Glomus intraradices* - RiT-DNA carrot root mycorrhizas. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 401-411, 2004a.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

EGEA, C.; DICKINSON, M. J.; CANDELA, M.; CANDELA, M. E. β -1,3-Glucanase isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 107, n. 3, p. 312-318, 1999.

ELSEN, A.; GERVACIO, D.; SWENNEN, R.; DE WAELE, D. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. **Mycorrhiza**, New York, v. 18, n. 5, p. 251-256, 2008.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A.. **Normas técnicas para o cultivo da videira em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1998. 50 p. (Epagri, Sistemas de Produção, 33).

EPAGRI/CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2007-2008**. Florianópolis: Epagri, 2008. 363 p.

FAUROBERT, M.; PELPOIR, E.; CHAĬB, J. Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. In: THIELLEMENT, H.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C.; MÉCHIN, V. (Eds). **Methods in Molecular Biology**, vol. 335: **Plant Proteomics: Methods and Protocols**. Humana Press Inc., 2007. p. 9-14.

FILION, M.; ST-ARNAUD, M.; FORTIN, J. A. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. **New Phytologist**, Oxford, v. 141, n. 3, p. 525-533, 1999.

FILION, M.; ST-ARNAUD, M.; JABAJI-HARE, S. H. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 2, p. 229-235, 2003.

FINNIE, C. E. **Annual Plant Reviews**, v. 28 - Plant proteomics. Oxford: Blackwell, 2006. 275 p.

GALLOTTI, G. J. M. Avaliação da resistência de *Vitis* spp. a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 74-77, 1991.

GALLOTTI, G. J. M. Causas do declínio da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 2, n. 4, p. 19-21, 1989.

GALLOTTI, G. J. M.; GRIGOLETTI JR., A. **Doenças fúngicas da videira e seu controle no estado de Santa Catarina**. Florianópolis: EMPASC, 1990. 46 p. (EMPASC. Boletim técnico, 51).

GALLOTTI, G. J. M.; SCHUCK, E. Ocorrência da fusariose em porta-enxertos de videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 4, n. 1, p. 47-49, 1991.

GARCIA-GARRIDO, J. M.; OCAMPO, J. A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 373, p. 1377-1386, 2002.

GARMENDIA, I.; AGUIRREOLEA, J.; GOICOECHEA, N. Defence-related enzymes in pepper roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Vorticillium dahliae*. **BioControl**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 293-310, 2006.

GARRIDO, L. da R.; SÔNEGO, O. R. **Chave para identificação de agentes causadores de declínio da videira**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 1999. 20 p. (EMBRAPA Uva e Vinho. Circular Técnica, 26).

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; GOMES, V. N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 322-324, 2004a.

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; URBEN, A.F. *Cylindrocarpon destructans* causador do “pé-preto” da videira no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 548-550, 2004b.

GERNNS, H.; VON ALTEN, H.; POEHLING, H-M. Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen – is a compensation possible? **Mycorrhiza**, New York, v. 11, n. 5, p. 237–243, 2001.

GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1871–1883, 1996.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; DUMAS-GAUDOT, E.; GOLLOTTE, A.; TAHIRI-ALAOUI, A.; GIANINAZZI, S. Cellular and molecular defence related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 133, n. 1, p. 45–57, 1996a.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; GOLLOTTE, A.; CORDIER, C.; GIANINAZZI, S. Root defence responses in relation to cell and tissue invasion by symbiotic microorganisms: cytological investigations. In: NICOLE, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V. (Eds.). **Histology, Ultrastructure and molecular cytology of plant-microorganism interactions**. Dordrecht: Kluwer, 1996b. p. 177–191.

GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; PATANKAR, A. G.; GUPTA, V. S.; SAIN-ANI, M. N.; DESHPANDE, V. V.; RANJEKAR, P. K. Association of induction of protease and chitinase in chickpea roots with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. **Plant Pathology**, v. 47, n. 6, p. 693–699, 1998.

GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 111–128, 1997.

GREEN, H.; LARSEN, J.; OLSSON, P. A.; JENSEN, D. F.; JAKOBSEN, I. I. Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *glomus intraradices* in root-free soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1428–1434, 1999.

GRIGOLETTI JR., A. **Fusariose da videira** – resistência de cultivares, sintomas e controle. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 1993. 20 p. (EMBRAPA-CNPUV. Circular Técnica, 18).

GRIGOLETTI JR., A. **Fusariose da videira, caracterização, variabilidade do *Fusarium oxysporum* f. sp. herbemontis e fontes de resistência em *Vitis* spp.** 1985. 76 f. Tese (Doutorado em Fitoaptologia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1985.

GÜMIL, S.; CHANG, H.-S.; ZHU, T.; SESMA, A.; OSBOURN, A.; ROUX, C.; IOANNIDIS, V.; OAKELEY, E. J.; DOCQUIER, M.; DESCOMBES, P.; BRIGGS, S. P.; PASZKOWSKI, U. Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 22, p. 8066–8070, 2005.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9-10, p. 449-454, 1996.

HALLEEN, F.; CROUS, P. W.; PETRINI, O. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 32, n. 1, p. 47-52, 2003.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1773-1791, 1996.

HARRIER, L. A. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. especial, p. 469-478, 2001.

HARRISON, M. J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, 361-389, 1999.

HAUSE, B.; FESTER, T. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Planta**, Heidelberg, v. 221, n. 2, p. 184-196, 2005.

HAUSE, B.; MAIER, W.; MIERSCH, O.; KRAMELL, R.; STRACK, D. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 3, p. 1213-1220, 2002.

HEAZLEWOOD, J. L.; MILLAR, A. H. Plant proteomics: challenges and resources. In: FINNIE, C. (Ed.). **Plant proteomics**. Oxford: Blackwell, 2006. p. 1-31.

HIGHET, A. S.; NAIR, N.G. *Fusarium oxysporum* associated with grapevine decline in the Hunter Valley, NSW, Australia. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Glen Osmond, v.1, n. 1, p. 48-50, 1995.

HODGE, A. Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 91-96, 2000.

HUANTE, P.; RINCON, E.; ALLEN, E. B. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on seedling growth of four tree species from the tropical deciduous forest in Mexico. **Mycorrhiza**, New York, v. 2, p. 141-145, 1993.

HUERTAS-GONZALEZ, M. D.; RUIZ-ROLDAN, M. C.; DI PIETRO, A.; RONCERO, M. I. G. Cross protection provides evidence for race-specific avirulence factors in *Fusarium oxysporum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 54, n. 3-4, p. 63-72, 1999.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. High-resolution two-dimensional gel electrophoresis: a cornerstone of plant proteomics. In: ŠAMAJ, J.; THELEN, J. J. (Ed.). **Plant proteomics**. New York: Springer, 2007. p. 14-28.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 1995-1996 – No 21, Santa Catarina. Rio de Janeiro: IBGE, 1997. 286 p.

IBGE – SIDRA: sistema IBGE de recuperação automática. Disponível em < <http://www.sidra.ibge.gov.br> >. Acesso em 10 de março de 2010.

ICEPA/SC – Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 1997. Florianópolis: ICEPA/SC. 1998. 154 p.

ICEPA/SC – Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2003-2004. Florianópolis: ICEPA/SC. 2004. 377 p.

iHOP –Information Hyperlinked over Proteins. 2010. Disponível em < <http://www.ihop-net.org> > . Acesso em 10 de março de 2010.

ISAACSON, T.; SARAVANAN, R.S.; HE, Y.; DAMASCENO, C.M.B.; CATALA, C.; SALADIE, M.; ROSE, J.K.C. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 2, p. 769-774, 2006.

JELLOULI, N.; BEN JOUIRA, H.; SKOURI, H.; GHORBEL, A.; GOURGOURI, A.; MLIKI, A. Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, n. 4, p. 471-481, 2008.

JL, C.; KUC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, n. 4, p. 257-265, 1996.

JOHANSEN, A.; JENSEN, E. S. Transfer of N and P from intact or decomposing roots of pea to barley interconnected by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 73-81, 1996.

JONER, E. J.; VAN AARLE, I. M.; VOSATKA, M. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: a review. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 226, n. 2, p. 190-210, 2000.

JONGEDIJK, E.; TIGELAAR, H.; VAN ROEKEL, J. S. C.; BRES-VLOEMANS, S. A.; DEKKER, I.; VAN DEN ELZEN, P. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. S. Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. **Euphytica**, Dordrecht, v. 85, n. 1-3, p. 173-180, 1995.

KARAGIANNIDIS, N.; NIKOLAOU, N. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Pb and Cd) uptake, growth, and chemical composition of *Vitis vinifera* L. (cv. Razaki). **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 51, n. 3, p. 269-275, 2000.

KARAGIANNIDIS, N.; NIKOLAOU, N.; IPSILANTIS, I.; ZIOZIOU, E. Effects of different N fertilizers on the activity of *Glomus mosseae* and on grapevine nutrition and berry composition. **Mycorrhiza**, New York, v. 18, n. 1, p. 43-50, 2007.

KARAGIANNIDIS, N.; NIKOLAOU, N.; MATTHEOU, A. Influence of 3 v-mycorrhiza species on the growth and nutrient-uptake of 3 grapevine rootstocks and one table grape cultivar. **Vitis**, Siebeldingen, v. 34, n. 2, p. 85-89, 1995.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases - Regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 8, n. 3, p. 809-824, 2003.

KAV, N. N. V.; SRIVASTAVA, S.; YAJIMA, W.; SHARMA, N. Application of proteomics to investigate plant-microbe interactions. **Current Proteomics**, Sharjah, v. 4, n. 1, p. 28-43, 2007.

KERSTEN, B.; NAGEL, A. (2010). GABI Primary Database – Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology. 2010. Disponível em < <http://www.gabipd.org> > . Acesso em 10 de março de 2010.

KERSTEN, B.; NAGEL, A. (2010). GABI Primary Database – Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology. 2010. Disponível em < <http://www.gabipd.org> > . Acesso em 10 de março de 2010.

KHAOSAAD, T.; GARCÍA-GARRIDO, J. M.; STEINKELLNER, S.; VIERHEILIG, H. Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 727-734, 2007.

KIM, S. T.; KANG, K. Y. Proteomics in plant defense response. In: AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R. (Ed.). **Plant proteomics: technologies, strategies, and applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008. p. 587-604.

KISTNER, C.; PARNISKE, M. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, n. 11, p. 511-518, 2002.

KLIEBENSTEIN, D. J.; ROWE, H. C. Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. **Plant Science**, Clare, v. 174, n. 6, p. 551-556, 2008.

KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 9, p. 915-923, 1997.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect vitymycorrhizas. **Mycological Research**, New York, v. 92, parte 4, p. 486-505, 1989.

KOTHARI, S. K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Effect of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentrations in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, Oxford, v. 117, n. 4, p. 649-655, 1991.

KRISHNA, H.; SINGH, S. K.; SHARMA, R. R.; KHAWALE, R. N.; GROVER, M.; PATEL, V. B. Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during ex vitro acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 4, p. 554-567, 2005.

KRISHNAVENI, S.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIANG, G. H.; WILDE, G.; MANICKAM, A. Induction of chitinases and β -1,3-glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. **Plant Science**, Clare, v. 144, n. 1, p. 9-16, 1999.

KRÓL, E. Fungi inhabiting decaying grapevine (*Vitis* spp.) cuttings. **Journal of Plant Protection Research**, Warsaw, v. 46, n. 4, p. 353-358, 2006.

KRUGER, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The protein protocols handbook**. 2. ed. Totowa: Humana Press Inc., 2002, p. 15-22.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 7-12, 2001.

LAMBAIS, M. R.; MEHDY, M. C. Spatial distribution of chitinases and β -1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. **New Phytologist**, Oxford, v. 140, n. 1, p. 33-42, 1998.

LEBEDA, A.; LUHOVA, L.; SEDLAROVA, M.; JANCOVA, D. The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions – Review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 108, n. 1, p. 89-111, 2001.

LESLIE, J. F.; SUMMEREL, B. A. (Eds.). **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Wiley-Blackwell, 2006. 388 p.

LEUBNER-METZGER, G.; MEINZ, F. Jr. Sense transformation reveals a novel role for class I β -1, 3-glucanase in tobacco seed germination. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 215-221, 2000.

LIMA DA SILVA, A.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de vigne *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bordeaux, v. 29, n. 1, p. 1-9, 1995.

LINDERMAN, R. G. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 33, p. 366-371, 1988.

LINDERMAN, R. G.; DAVIS, E. A. Comparative response of selected grapevine rootstocks and cultivars to inoculation with different mycorrhizal fungi. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 52, n. 1, p. 8-11, 2001.

LIU, J.; BLAYLOCK, L. A.; ENDRE, G.; CHO, J.; TOWN, C. D.; VANDEN-BOSCH, K. A.; HARRISON, M. J. Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 9, p. 2106-2123, 2003.

MADRID, M. P.; DI PIETRO, A.; RONCERO, M. I. G. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 257-266, 2003.

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 159, n. 1, p. 89-102, 1994.

MARSH, J. F.; SCHULTZE, M. Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. **New Phytologist**, Oxford, v. 150, n. 3, p. 525-532, 2001.

MARSONI, M.; BRACALE, M.; ESPEN, L.; PRINSI, B.; NEGRI, A.; VANNINI, C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 2, p. 347-356, 2008.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal Hydrolases in Pea Tissue : II. Inhibition of Fungal Growth by Combinations of Chitinase and β -1,3-Glucanase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 3, p. 936-942, 1988.

MELLO, L. M. R. de. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2009**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. 4 p.

MICHAUD, D.; ASSELIN, A. Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 698, n. 1-2, p. 263-279, 1995.

MOHR, U.; LANGE, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Plant defence genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani*, but not in the symbiotic interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **New Phytologist.**, Oxford, v. 138, n. 4, p. 589-598, 1998.

NAGARAJ, S.; LEI, Z.; WATSON, B.; SUMNER, L.; GALLARDO, K.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G.; ROBERT, F.; THIERY, O.; VALOT, B.; MATHESIU, U.; OELKERS, K. Proteomics of *Medicago truncatula*. In: MATHE-SIU, U. (Ed.) **The *Medicago truncatula* handbook**. Ardmore: The Samuel Roberts Noble Foundation, 2007. p. 1-62.

NATERA, S. H.; GUERREIRO, N.; DJORDJEVIC, M. A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, n. 9, p. 995-1009, 2000.

NEL, B.; STEINBERG, C.; LABUSCHAGNE, N.; VILJOEN, A. Isolation and characterization of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from the rhizosphere of healthy banana plants. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 207-216, 2006.

NELSON P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASSAS, W. F. O. **Fusarium species, an illustrated manual for identification**. Pennsylvania State University, University Park and London, 193 p, 1983.

NIKOLAOU, N.; ANGELOPOULOS, K.; KARAGIANNIDIS, N. Effects of drought stress on mycorrhizal and non-mycorrhizal Cabernet Sauvignon grapevine, grafted onto various rootstocks. **Experimental Agriculture**, New York, v. 39, n. 3, p. 241-252, 2003.

NIKOLAOU, N.; KARAGIANNIDIS, N.; KOUNDOURAS, S.; FYSARAKIS, I. Effects of different P sources in soil on increasing growth and mineral uptake of mycorrhizal *Vitis vinifera* L. (cv Vitoria) vines. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bordeaux, v. 36, n. 4, p. 195-204, 2002.

NÓBREGA, F. M.; SANTOS, I. S.; CUNHA, M. DA; CARVALHO A. O.; GOMES, V. M. Antimicrobial proteins from cowpea root exudates: inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and purification of a chitinase-like protein. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 272, n. 1-2, p. 223-232, 2005.

NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Interações microbianas na disponibilidade e absorção de manganês por soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1605-1612, 2002.

NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Mycorrhizal effectiveness and manganese toxicity in soybean as affected by soil type and endophyte. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p.329-335, 2003.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975

OKUBARA, P.; PAULITZ, T. Root defense responses to fungal pathogens: a molecular perspective. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, n. 1-2, p. 215-226, 2005.

OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, Oxford, v. 137, n. 3, p. 481-494, 1997.

OMER, A. D.; GRANETT, J.; WAKEMAN, R. J. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* on different *Vitis* rootstocks. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 147, n. 7-8, p. 433-436, 1999.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 10, p. 763-775, 2008.

PARNISKE, M. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 320-328, 2000.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, New York, v. 33, n. 3 (suplemento), p. 311-323, 2003.

PECK, S. C. Update on proteomics in *Arabidopsis*. Where do we go from here? **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, n. 2, p. 591-599, 2005.

PÉREZ, M.; URCELAY, C. Differential growth response to arbuscular mycorrhizal fungi and plant density in two wild plants belonging to contrasting functional types. **Mycorrhiza**, New York, v. 19, n. 8, p. 517-523, 2009.

PETIT, E; GUBLER, W. D. Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. **Plant Disease**, v. 90, n. 12, p. 1481-1484, 2006.

PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Signalling cascades involved in induced resistance. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Eds.). **Induced resistance for plant defence**: a sustainable approach to crop protection. Oxford: Blackwell, 2007. p. 65-88.

POSTA, K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal maize. **Mycorrhiza**, New York, v. 5, n. 2, p. 119-124, 1994.

POZO, M. J.; AZCÓN-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, n. 4, p. 393-398, 2007.

POZO, M. J.; AZCON-AGUILAR, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BAREA, J. M. Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 327, p. 1729-1739, 1998.

POZO, M. J.; AZCON-AGUILAR, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BAREA, J. M. β -1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. **Plant Science**, Clare, v. 141, p. 2, p. 149-157, 1999.

POZO, M. J.; CORDIER, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 368, p. 525-534, 2002a.

POZO, M. J.; LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. Jasmonates - Signals in Plant-Microbe Interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 23, n. 3, p. 211-222, 2005.

POZO, M. J.; SLEZACK-DESCHAUMES, S.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; AZCÓN-AGUILAR, C. Plant defense responses induced by arbuscular mycorrhizal fungi. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H.; BAREA, J. M.; HASEL-WANDLER, K. (Eds.). **Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts**. Basel: Birkhäuser, 2002b. p. 103-111.

POZO, M. J.; VERHAGE, A.; GARCÍA-ANDRADE, J.; GARCÍA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. In: AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. (Eds.). **Mycorrhizas - functional processes and ecological impact**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. p. 123-135.

RAMAGLI, L. S.; RODRIGUEZ, L. V. Quantification of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 6, n. 11, p. 559-563, 1985.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 239, n. 1, p. 55-68, 2002.

RAMPITSCH, C.; SRINIVASAN, M. The application of proteomics to plant biology: a review. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 84, n. 6, p. 883-892, 2006.

RECORBET, G.; STEINBERG, C.; OLIVAIN, C.; EDEL, V.; TROUVELOT, S.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; ALABOUVETTE, C. Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, Oxford, v. 159, n. 1, p. 73-92, 2003.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean Fungi from the Ordovician. **Science**, Washington, v. 289, n. 5486, p. 1920-1921, 2000.

RÉDEI, G. P. **Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics**. 3^a ed. New York: Springer-Verlag, 2008. 1822 p.

REMY, W.; TAYLOR, T. N.; HASS, H.; KERP, H. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 25, p. 11841-11843, 1994.

REP, M.; VAN DER DOES, H. C.; MEIJER, M.; VAN WIJK, R.; HOUTERMAN, P. M.; DEKKER, H. L.; DE KOSTER, C. G.; CORNELISSEN, B. J. C. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 1373-1383, 2004.

REQUENA, N.; SERRANO, E.; OCÓN, A.; BREUNINGER, M. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 33-40, 2007.

ROSSIGNOL, M. Analysis of the plant proteome. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 12, n. 2, p. 131-134, 2001.

RUIZ-LOZANO, J. M.; AZCON, R.; GOMEZ, M. Effects of arbuscular-mycorrhizal glomus species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 2, p. 456-460, 1995.

SALZER, P.; BONANOMI, A.; BEYER, K.; VÖGELL-LANGE, R.; AESCHBACHER, R. A.; LANGE, J.; WIEMKEN, A.; KIM, D.; COOK, D. R.; BOLLER, T. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, n. 7, p. 763-777, 2000.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Joaçaba– Caracterização Regional**. Florianópolis: ICEPA/SC, 2003. 38 p.

SARAVANAN, R. S.; ROSE, J. K. C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 9, p. 2.522-2.532, 2004.

SCHAEFER, H. Über Extraktion von Proteinen und Enzymen aus verholzten Rebenorganen. I. Extraktion für die elektrophoretische Auftrennung. **Wein-Wiss**, v. 32, p. 269-288, 1977.

SCHOFFELMEER, E. A. M.; KLIS, F. M.; SIETSMA, J. H.; CORNELISSEN, B. J. C. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 27, p. 2-3, p. 275-282, 1999.

SCHUBERT, A.; CAMMARATA, S.; EYNARD, I. Growth and root colonization of grapevines inoculated with different mycorrhizal endophytes. **Hortscience**, Alexandria, v. 23, n. 2, p. 302-303, 1988.

SCHUCK, E.; ANDRADE, E. R. de; GALLOTTI, G. J. M.; DAL BÓ, M. A. Novas alternativas na busca de soluções para o controle do declínio da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 6, n. 4, p. 48-50, 1993.

SCHUCK, E.; DAL BÓ, M. A.; ANDRADE, E. R. de; ROSIER, J. P. Uva. In: EPAGRI. **Avaliação de cultivares para o estado de Santa Catarina 2007/2008**. Florianópolis: EPAGRI, p. 139-143, 2007. (EPAGRI, Boletim Técnico no. 137).

SCHÜSSLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Oxford, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SLEZACK, S.; DUMAS-GAUDOT, E.; PAYNOT, M.; GIANINAZZI, S. Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, n. 2, p. 238-241, 2000.

SLEZACK, S.; DUMAS-GAUDOT, E.; ROSENDAHL, S.; KJOLLER, R.; PAYNOT, M.; NEGREL, J.; GIANINAZZI, S. Endoproteolytic activities in pea roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and/or *Aphanomyces euteiches* in relation to bioprotection. **New Phytologist**, Oxford, v. 142, n. 3, p. 517-529, 1999.

SMITH, G. S.; JOHNSTON, C. M.; CORNFORTH, I. S. Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture. **New Phytologist**, Oxford, v. 94, n. 4, p. 537-548, 1983.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 605 p.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3ª ed. London: Academic Press, 2008. 815 p.

SOLAIMAN, M. Z.; SAITO, M. Phosphate efflux from intraradical hyphae of *Gigaspora margarita* in vitro and its implication for phosphorus translocation. **New Phytologist**, Oxford, v. 151, n. 2, p. 525-533, 2001.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; GRIGOLETTI JR., A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 32 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica 56).

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de Resistência de Plantas a Fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Org.). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis, 2004, p. 221-244.

TAGLIARI, P. S. Declínio da videira já tem controle no Sul do Brasil. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 19, n. 2, p. 31-34, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3ª ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. 690 p.

TEUNISSEN, H. A.; VERKOOIJEN, J.; CORNELISSEN, B. J.; HARING, M. A. Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. **Molecular Genetics and Genomics**, New York, v. 268, n. 3, p. 298-310, 2002.

THANGAVELU, R.; PALANISWAMI, A.; DORAISWAMY, S.; VELAZHAHAN, R. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on induction of defense enzymes and phenolics in banana. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 46, n. 1, p. 107-112, 2003.

THURSTON, G.; REGAN, S.; RAMPITSCH, C.; XING, T. Proteomic and phosphoproteomic approaches to understand plant-pathogen interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, n. 1-2, p. 3-11, 2005.

TOCHETTO, A. Fusariose da parreira. **Revista Agrônômica**, Porto Alegre, v. 17, n. 209-211, p. 82-89, 1954.

TRAPPE, J. What is a mycorrhiza? In: AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. (Eds.). **Mycorrhizas in integrated systems: from genes to plant development**. Bruxelas: European Commission, 1996. p. 3-6.

TRILLAS, M. I.; COTXARRERA, L.; CASANOVA, E.; CORTADELLAS, N. Ultrastructural changes and localization of chitin and callose in compatible and incompatible interactions between carnation callus and *Fusarium oxysporum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 56, n. 3, p. 107-116, 2000.

TROUVELOT, A.; KOUGH, J. L.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. **Mycorrhizae: physiology and genetics**. Dijon: CNRS-INRA, 1986, p. 217-221.

TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 85-93, 2001.

VAAST, PH.; ZASOSKI, R. J.; BLEDSOE, C. S. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation at different soil P availabilities on growth and nutrient uptake of in vitro propagated coffee (*Coffea arabica* L.) plants. **Mycorrhiza**, New York, v. 6, n. 6, p. 493-497, 1996.

VALOT, B.; DIEU, M.; RECORBET, G.; RAES, M.; GIANINAZZI, S.; DUMAS-GAUDOT, E. Identification of membrane-associated proteins regulated by the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 59, n. 4, p. 565-580, 2005.

VALOT, B.; DIEU, M.; RECORBET, G.; RAES, M.; GIANINAZZI, S.; DUMAS-GAUDOT, E. Identification of membrane-associated proteins regulated by the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 59, n. 4, p. 565-580, 2005.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN WEES, S. C.; VAN DER ENT, S.; PIETERSE, C. M. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, n. 4, p. 443-448, 2008.

VARGHESE, J. N.; GARRETT, T. P.; COLMAN, P. M.; CHEN, L.; HOJ, P. B.; FINCHER, G. B. Three-dimensional structures of two plant β -glucan endohydrolases with distinct substrate specificities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 7, p. 2785-2789, 1994.

VIERHEILIG, H.; STEINKELLNER, S.; KHAOSAAD, T.; GARCIA-GARRIDO, J. M. The biocontrol effect of mycorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects? In: VARMA, A. (Ed.). **Mycorrhiza - state of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. p. 307-320.

VOLPIN, H.; PHILLIPS, D. A.; OKON, Y.; KAPLLLLNIK, Y. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, n. 4, p. 1449-1454, 1995.

WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 27, n. 13, p. 2.782–2.786, 2006.

WEISS, W.; GÖRG, A. High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis. In: REINDERS, J.; SICKMANN, A. (Eds). **Methods in Molecular Biology, vol. 564: Proteomics: Methods and Protocols**. Humana Press Inc., 2009. p. 13-32.

WHIPPS, J. M. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 82, n. 8, p. 1198-1227, 2004.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Microplate colourimetric assay for endoacting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 511-519, 1992.

XAVIER, L. J. C.; BOYETCHKO, S. M. Arbuscular mycorrhizal fungi in plant disease control. In: ARORA, D. K. (Ed.). **Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications**. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 183-194.

ZEMKE, J. M. **Fungos micorrízicos arbusculares na aclimatização e no controle biológico da fusariose em porta-enxertos micropropagados de videira (*Vitis* spp)**. 2003. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ZHU, H. H.; YAO, Q. Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 10, p. 537-542, 2004.

ANEXOS

Anexo A. Número de identificação (NI), ponto isoeétrico (pI), massa molecular (MM) e volume relativo (%) de bandas de proteínas do sistema radicular de videiras sem alteração no nível de expressão acima de fator igual a dois de acordo com os tratamentos testados. Mudanças micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4 foram submetidas à inoculação com *Glomus intraradices* (Gi) e/ou *Fusarium* spp. (Fo) e amostradas no momento da inoculação (0 dai) e aos 14 dias (14 dai) após a inoculação do patógeno.

NI	pI	MM	0 dai			P ^(a)		14 dai ^(b)			P ^(a)		
			-Gi	+Gi	Gi	ns	**	-Gi -Fo	+Gi -Fo	-Gi +Fo	+Gi +Fo	Gi	Fo
184	6,7	55	0,27	0,30	ns	ns		0,17	0,23	0,14	0,37	**	ns
178	6,5	52	0,57	0,47	ns	ns		0,49	0,78	0,41	0,82	**	ns
173	6,8	49	0,50	0,64	ns	ns		0,42	0,69	0,54	0,82	*	ns
087	7,4	34	0,30	0,59	*	*		0,53	0,71	0,42	0,70	*	ns
009	6,1	14	3,02	0,75	**	**		3,28	2,70	4,02	2,07	**	ns
109	5,8	37	1,71	0,75	**	**		1,75	0,83	1,81	1,10	*	ns
110	6,2	37	1,58	0,52	***	***		1,10	0,73	1,32	0,98	*	ns
200	5,8	60	0,71	0,29	**	**		0,67	0,50	0,70	0,45	**	ns
202	5,8	60	0,65	0,35	*	*		0,65	0,51	0,63	0,40	**	ns
134	6,1	42	0,46	0,39	ns	ns		0,53	0,21	0,50	0,37	**	ns
127	5,2	41	0,33	0,28	ns	ns		0,60	0,42	0,70	0,34	**	ns
098	5,9	34	0,70	0,22	**	**		0,74	0,44	0,63	0,31	***	ns
001	7,3	11	0,44	0,18	*	*		0,41	0,22	0,47	0,27	*	ns
204	6,8	63	0,40	0,21	*	*		0,35	0,14	0,29	0,27	*	ns
140	6,8	43	0,49	0,27	ns	ns		0,30	0,16	0,39	0,46	ns	*
257	7,1	23	0,43	0,28	*	*		0,33	0,24	0,36	0,21	*	ns

NI	pI	MM	0 dai		P ^(a)		14 dai ^(b)				P ^(a)		
			-Gi	+Gi	Gi		-Gi -Fo	+Gi -Fo	-Gi +Fo	+Gi +Fo	Gi	Fo	Gi x Fo
282	7,0	35	0,11	0,13	ns		0,21	0,24	0,29	0,54	ns	*	ns
122	6,8	40	0,51	0,69	ns		0,30	0,47	0,71	0,63	ns	*	ns
021	6,9	19	0,41	0,36	ns		0,32	0,42	0,52	0,69	ns	**	ns
155	6,5	47	0,64	0,39	ns		0,87	0,83	0,48	0,68	ns	*	ns
126	5,4	41	2,32	1,79	ns		2,40	2,82	2,23	1,73	ns	*	ns
112	6,1	39	0,40	0,24	ns		0,47 a	0,18 b	0,42 a	0,34 a	**	ns	*
024	7,1	19	0,05	0,08	ns		0,04 ab	0,02 b	0,04 ab	0,09 a	ns	*	*
085	6,0	33	0,21	0,48	**		0,18 ab	0,01 b	0,08 ab	0,24 a	ns	ns	**
130	6,5	41	0,38	0,38	ns		0,33 ab	0,15 b	0,11 b	0,46 a	ns	ns	**
114	7,3	38	0,06	0,16	**		0,28 ab	0,25 ab	0,11 b	0,36 a	ns	ns	*
171	6,0	50	1,41	0,85	ns		1,33 a	1,98 a	1,93 a	1,29 a	ns	ns	*
163	6,1	48	1,35	0,96	ns		1,05 a	2,04 a	1,55 a	1,21 a	ns	ns	*
107	5,4	37	1,13	0,97	ns		1,18 a	1,68 a	1,52 a	1,19 a	ns	ns	*
123	6,6	39	0,26	0,40	ns		0,33 a	0,13 a	0,19 a	0,45 a	ns	ns	*
099	6,4	33	0,71	0,26	***		0,65	0,47	0,45	0,62	ns	ns	ns
185	6,9	56	0,06	0,20	***		0,09	0,11	0,07	0,16	ns	ns	ns
074	7,2	32	0,05	0,16	**		0,11	0,12	0,09	0,18	ns	ns	ns
280	6,9	49	0,04	0,35	**		0,22	0,25	0,15	0,25	ns	ns	ns

NI	pI	MM	0 dai		P ^(a)		14 dai ^(b)				P ^(a)			
			-Gi	+Gi	Gi		-Gi	-Fo	+Gi	-Fo	-Gi	+Fo	+Gi	Fo
151	5,6	48	0,32	0,11	**		0,19	0,30	0,25	0,36	ns	ns	ns	ns
096	6,7	34	0,71	0,38	**		0,47	0,44	0,53	0,45	ns	ns	ns	ns
069	7,7	30	0,85	0,26	*		0,54	0,47	0,75	0,45	ns	ns	ns	ns
170	7,1	49	0,11	0,31	*		0,12	0,06	0,07	0,10	ns	ns	ns	ns
215	6,4	73	0,11	0,25	*		0,13	0,14	0,07	0,26	ns	ns	ns	ns
205	6,7	64	0,44	0,20	*		0,34	0,24	0,32	0,36	ns	ns	ns	ns
091	6,5	34	0,13	0,31	*		0,20	0,22	0,26	0,39	ns	ns	ns	ns
019	5,9	21	1,53	0,45	*		1,26	0,66	0,90	0,33	ns	ns	ns	ns
006	10	13	0,67	1,92	*		0,77	2,24	0,94	1,45	ns	ns	ns	ns
197	5,3	58	0,74	0,48	*		0,79	0,83	0,64	0,58	ns	ns	ns	ns
167	5,2	50	2,18	1,47	ns		1,79	2,76	2,04	1,97	ns	ns	ns	ns
142	5,6	45	0,37	0,20	ns		0,44	0,42	0,40	0,44	ns	ns	ns	ns
011	5,2	14	0,56	0,15	ns		0,60	0,57	0,58	0,26	ns	ns	ns	ns
083	5,5	33	0,29	0,47	ns		0,27	0,10	0,22	0,33	ns	ns	ns	ns
193	5,1	59	0,08	0,15	ns		0,17	0,04	0,12	0,10	ns	ns	ns	ns
128	5,6	41	0,19	0,32	ns		0,37	0,29	0,69	0,29	ns	ns	ns	ns
093	5,6	34	0,76	0,49	ns		0,59	0,51	0,63	0,32	ns	ns	ns	ns
183	6,8	55	0,18	0,26	ns		0,17	0,17	0,16	0,25	ns	ns	ns	ns

NI	pI	MM	0 dai		P ^(a)		14 dai ^(b)				P ^(a)			
			-Gi	+Gi	Gi		-Gi -Fo	+Gi -Fo	-Gi +Fo	+Gi +Fo	Gi	Fo	Gi x Fo	
211	6,4	67	0,29	0,16	ns		0,22	0,19	0,19	0,27	ns	ns	ns	ns
077	5,7	32	0,12	0,22	ns		0,19	0,11	0,19	0,27	ns	ns	ns	ns
267	5,3	32	0,66	0,41	ns		0,38	0,36	0,40	0,33	ns	ns	ns	ns
157	5,8	50	0,59	0,43	ns		0,67	0,98	0,90	0,55	ns	ns	ns	ns
172	7,7	50	1,91	1,27	ns		2,26	1,88	2,52	2,34	ns	ns	ns	ns
062	4,6	29	0,18	0,27	ns		0,12	0,09	0,10	0,15	ns	ns	ns	ns
208	5,9	68	0,08	0,12	ns		0,09	0,06	0,04	0,04	ns	ns	ns	ns
293	8,5	33	0,94	0,13	ns		0,76	1,11	0,75	1,42	ns	ns	ns	ns
105	5,9	36	1,21	1,04	ns		1,69	2,99	1,65	1,06	ns	ns	ns	ns
177	7,5	51	0,29	0,15	ns		0,21	0,06	0,20	0,27	ns	ns	ns	ns
295	7,9	34	0,41	0,15	ns		0,18	0,04	0,17	0,16	ns	ns	ns	ns
080	6,3	32	0,20	0,31	ns		0,17	0,29	0,21	0,27	ns	ns	ns	ns
117	7,1	38	0,89	0,59	ns		1,17	1,62	1,25	1,67	ns	ns	ns	ns
292	8,7	37	0,16	0,32	ns		0,11	0,13	0,16	0,18	ns	ns	ns	ns
162	4,8	49	1,45	1,19	ns		1,62	1,55	1,91	1,28	ns	ns	ns	ns
106	5,6	36	1,80	1,43	ns		1,54	1,97	1,56	1,28	ns	ns	ns	ns
084	4,4	33	0,05	0,09	ns		0,13	0,09	0,10	0,13	ns	ns	ns	ns
078	5,4	32	0,52	0,75	ns		0,29	0,45	0,57	0,51	ns	ns	ns	ns

NI	pI	MM	0 dai		P ^(a)		14 dai ^(b)				P ^(a)			
			-Gi	+Gi	Gi		-Gi	-Fo	+Gi	-Fo	-Gi	+Fo	+Gi	Fo
039	6,3	25	0,07	0,13	ns		0,11	0,06	0,10	0,13	ns	ns	ns	ns
129	5,0	42	0,08	0,12	ns		0,09	0,01	0,06	0,12	ns	ns	ns	ns
216	4,7	74	0,29	0,35	ns		0,48	0,50	0,43	0,57	ns	ns	ns	ns
168	7,4	50	0,21	0,29	ns		0,27	0,15	0,16	0,19	ns	ns	ns	ns
165	6,6	49	0,30	0,41	ns		0,46	0,51	0,24	0,51	ns	ns	ns	ns
283	5,2	48	0,55	0,40	ns		0,63	0,32	0,36	0,49	ns	ns	ns	ns
073	6,9	31	0,21	0,26	ns		0,35	0,44	0,46	0,47	ns	ns	ns	ns
194	6,8	59	0,19	0,24	ns		0,12	0,03	0,09	0,11	ns	ns	ns	ns
064	5,7	29	0,36	0,20	ns		0,20	0,17	0,34	0,14	ns	ns	ns	ns
210	5,6	67	0,18	0,24	ns		0,06	0,12	0,05	0,12	ns	ns	ns	ns
288	10	15	0,22	0,40	ns		0,54	0,88	0,69	0,63	ns	ns	ns	ns
189	5,4	58	0,85	0,73	ns		0,86	1,27	0,83	0,73	ns	ns	ns	ns
224	5,3	100	0,20	0,26	ns		0,32	0,26	0,27	0,26	ns	ns	ns	ns
000	6,7	99	0,23	0,30	ns		0,17	0,23	0,14	0,24	ns	ns	ns	ns
060	4,5	28	0,36	0,27	ns		0,32	0,22	0,28	0,15	ns	ns	ns	ns
100	6,3	35	0,21	0,25	ns		0,56	0,17	0,36	0,53	ns	ns	ns	ns
044	6,1	25	0,32	0,37	ns		0,53	0,75	0,61	0,59	ns	ns	ns	ns
119	6,0	39	0,27	0,33	ns		0,38	0,30	0,33	0,26	ns	ns	ns	ns

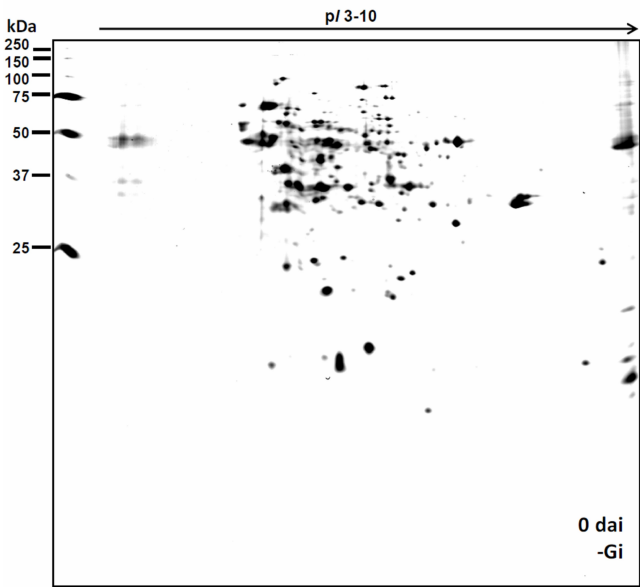
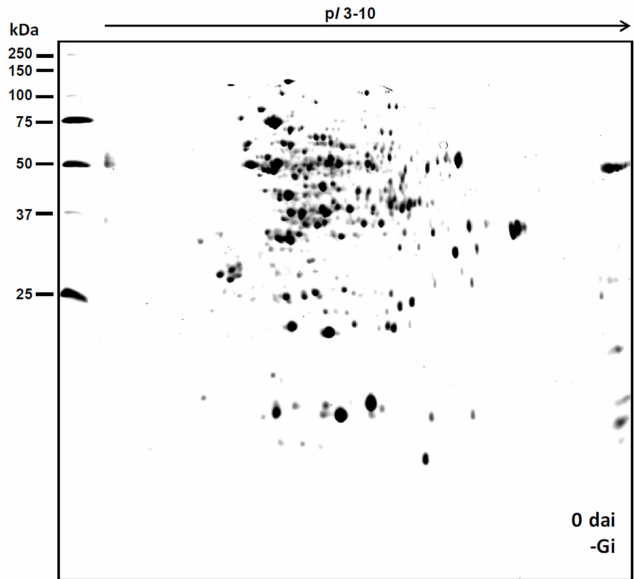
NI	pI	MM	0 dai		P ^(a)		14 dai ^(b)				P ^(a)		
			-Gi	+Gi	Gi		-Gi -Fo	+Gi -Fo	-Gi +Fo	+Gi +Fo	Gi	Fo	Gi x Fo
154	7,3	48	0,54	0,47	ns		0,77	0,82	0,38	0,66	ns	ns	ns
247	5,8	45	0,58	0,33	ns		1,27	1,64	1,17	1,34	ns	ns	ns
272	10	51	0,65	0,39	ns		0,45	0,66	0,59	0,25	ns	ns	ns
188	6,1	55	0,66	0,58	ns		0,59	0,48	0,52	0,57	ns	ns	ns
212	5,2	71	4,15	3,92	ns		3,89	6,01	4,50	4,27	ns	ns	ns
094	6,9	34	0,04	0,05	ns		0,11	0,24	0,21	0,33	ns	ns	ns
125	5,8	41	0,20	0,24	ns		0,24	0,24	0,19	0,19	ns	ns	ns
182	4,7	55	0,37	0,31	ns		0,37	0,46	0,37	0,43	ns	ns	ns
264	5,1	49	0,53	0,46	ns		0,59	0,60	0,35	0,62	ns	ns	ns
217	6,4	80	0,13	0,16	ns		0,12	0,12	0,06	0,19	ns	ns	ns
023	6,8	20	0,34	0,38	ns		0,30	0,24	0,32	0,34	ns	ns	ns
144	5,5	45	0,50	0,54	ns		0,83	0,57	0,59	0,59	ns	ns	ns
220	6,8	83	0,40	0,47	ns		0,37	0,24	0,21	0,37	ns	ns	ns
219	6,9	82	0,36	0,42	ns		0,36	0,24	0,19	0,32	ns	ns	ns
221	5,8	87	0,20	0,22	ns		0,23	0,22	0,23	0,20	ns	ns	ns
209	5,4	65	0,68	0,73	ns		0,61	0,59	0,46	0,55	ns	ns	ns
042	5,8	25	0,52	0,57	ns		0,78	1,03	0,86	0,65	ns	ns	ns
156	9,8	49	0,81	0,66	ns		0,76	0,63	0,53	0,54	ns	ns	ns

			0 dai			P ^(a)		14 dai ^(b)				P ^(a)		
NI	pI	MM	-Gi	+Gi	Gi	-Gi -Fo	+Gi -Fo	-Gi +Fo	+Gi +Fo	Gi	Fo	Gi x Fo		
038	9,7	24	0,14	0,17	ns	0,16	0,12	0,19	0,24	ns	ns	ns		
181	5,6	55	0,34	0,32	ns	0,35	0,27	0,40	0,25	ns	ns	ns		
158	5,7	48	0,50	0,47	ns	0,34	0,57	0,29	0,28	ns	ns	ns		
160	6,5	49	0,90	0,82	ns	0,71	1,07	0,69	1,07	ns	ns	ns		
225	6,4	96	0,74	0,67	ns	0,72	0,88	0,52	0,83	ns	ns	ns		
291	8,6	36	0,67	0,74	ns	0,75	0,34	1,39	0,81	ns	ns	ns		
195	4,8	59	0,53	0,56	ns	0,48	0,77	0,46	0,61	ns	ns	ns		
120	6,3	39	0,07	0,08	ns	0,21	0,08	0,17	0,24	ns	ns	ns		
218	5,0	80	0,45	0,46	ns	0,54	0,38	0,46	0,36	ns	ns	ns		
176	5,1	53	0,60	0,61	ns	0,57	0,52	0,51	0,64	ns	ns	ns		
152	6,3	47	0,23	0,22	ns	0,41	0,47	0,01	0,27	ns	ns	ns		
226	6,4	98	0,20	0,21	ns	0,28	0,18	0,12	0,27	ns	ns	ns		
133	6,3	42	0,45	0,45	Ns	0,48	0,37	0,28	0,47	ns	ns	ns		

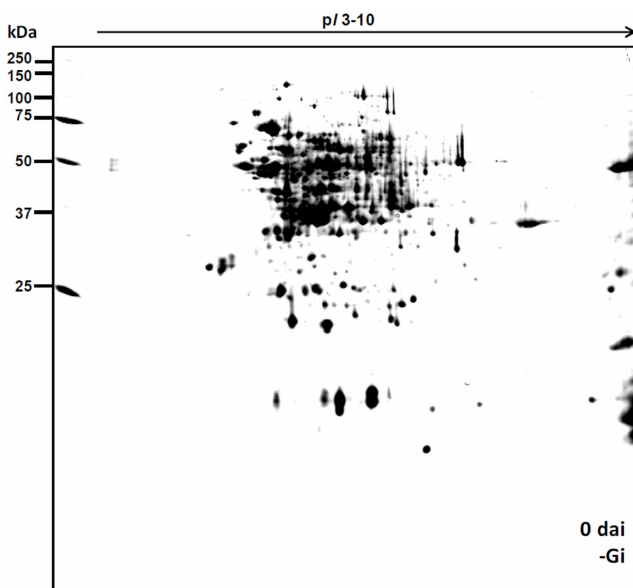
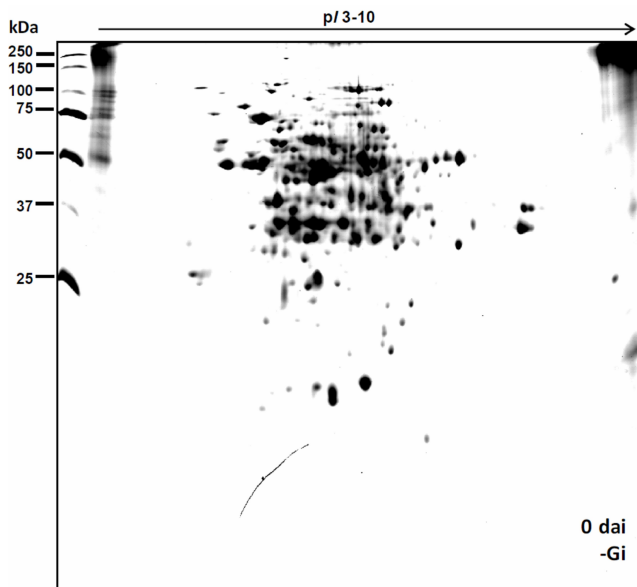
^(a) Probabilidade, de acordo com teste F, para as causas de variação Gi, Fo ou Gi x Fo em cada amostragem (0 e 14 dai); n=6.

* P≥0,05; ** P≥0,01; *** P≥0,001; ns, não significativo.

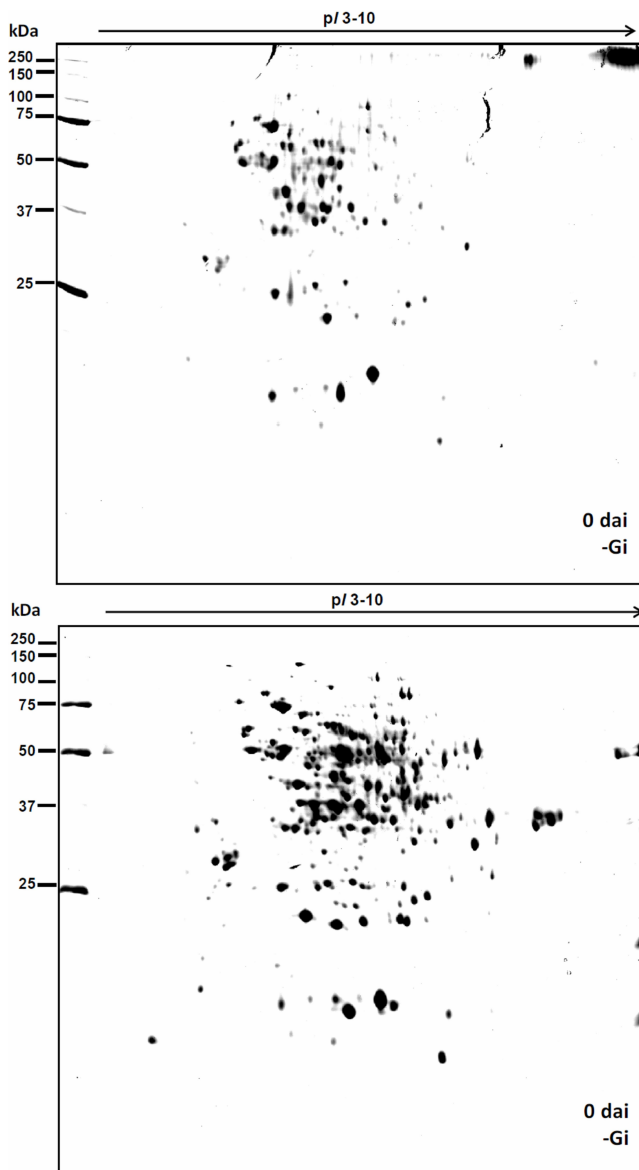
^(b) médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls (P≤0,05; n=6).



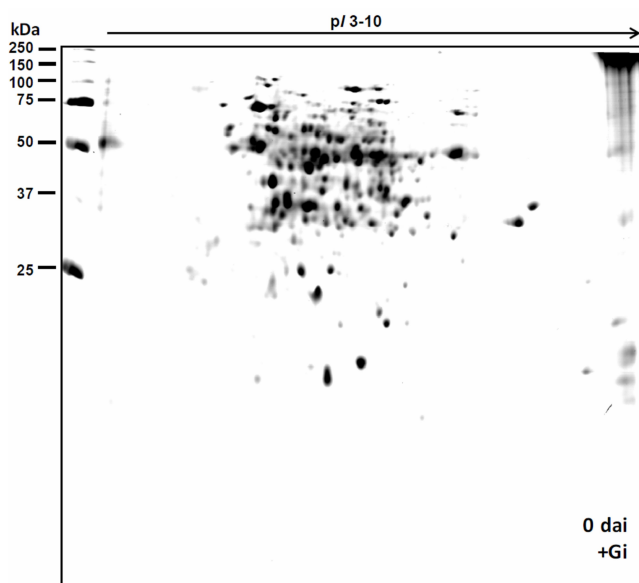
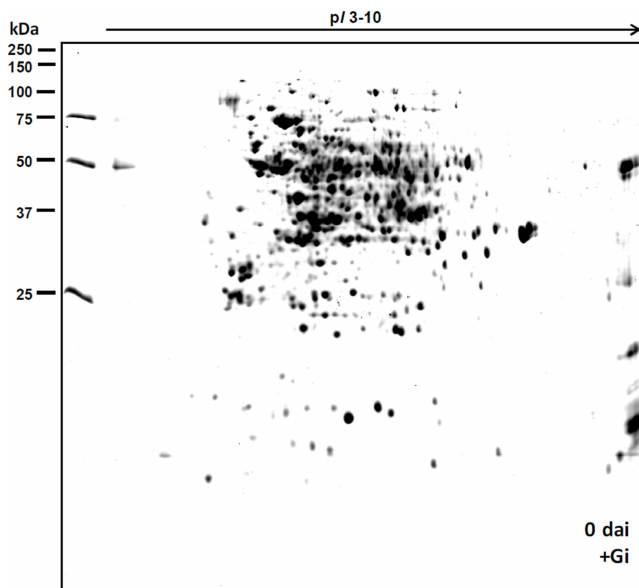
continua....



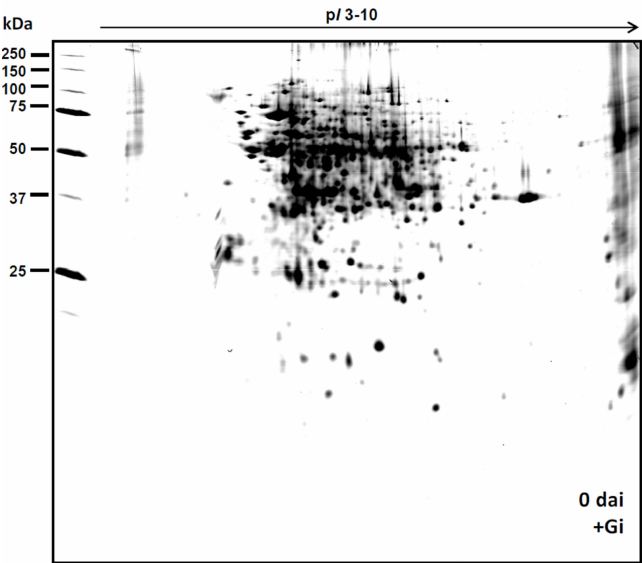
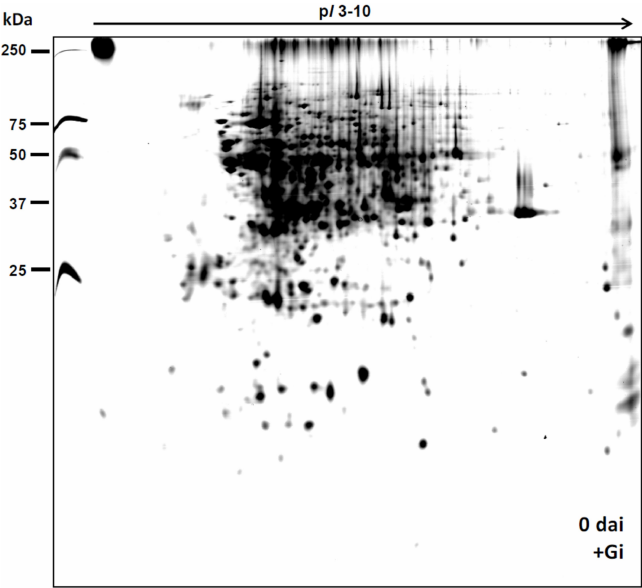
continua....



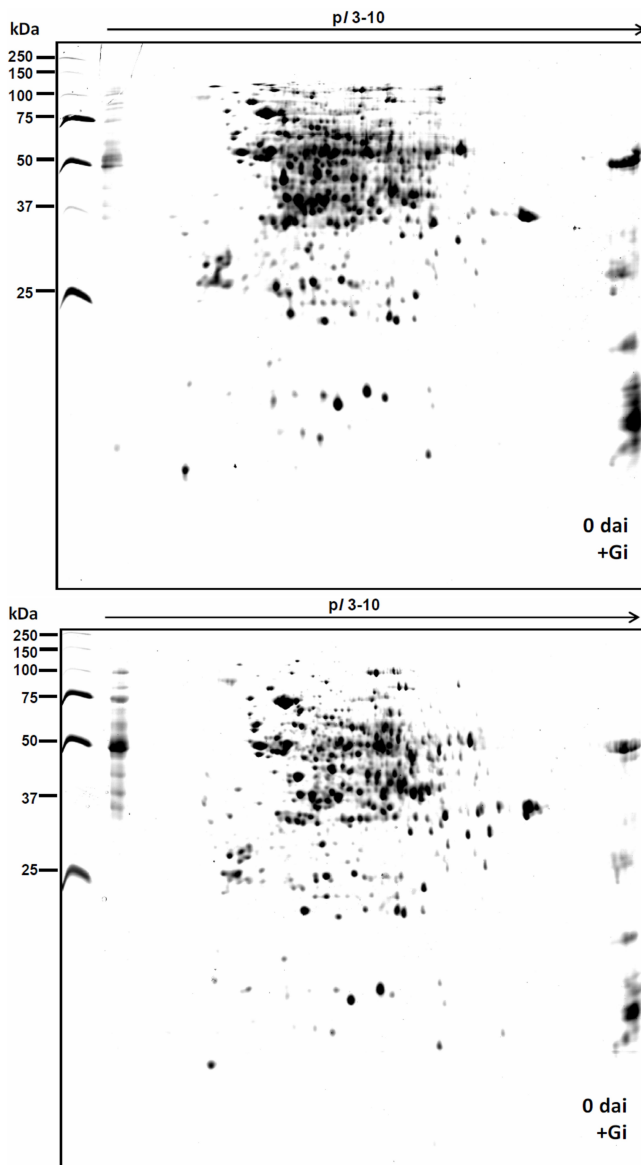
Anexo B. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 não inoculadas com *Glomus intraradices* (-Gi) e amostradas no momento da inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. herbemontis (0 dai).



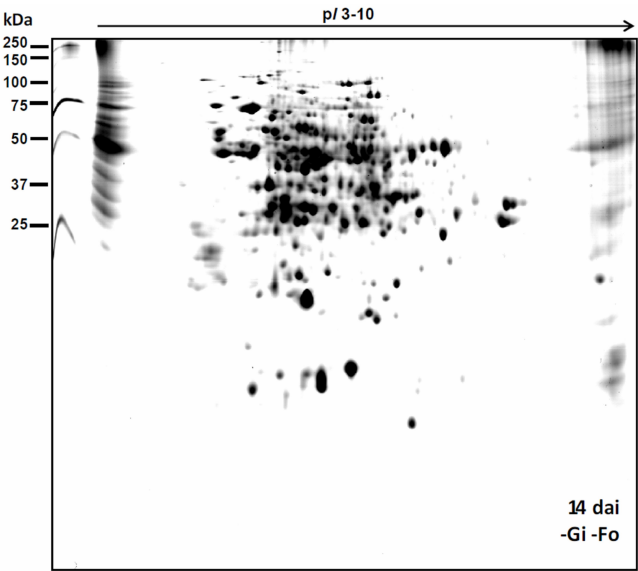
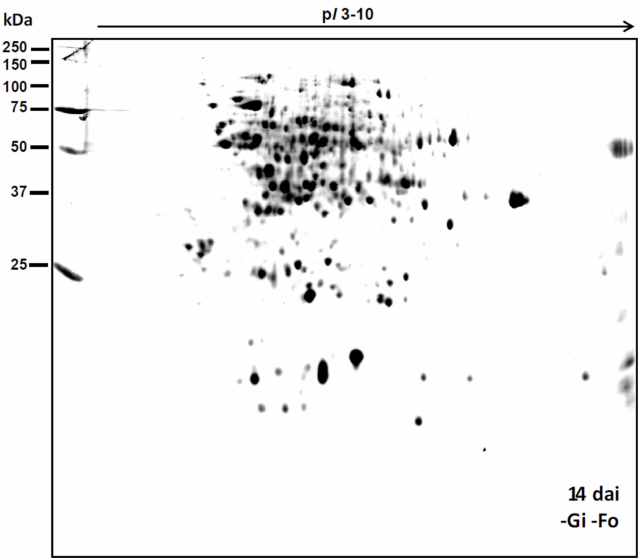
continua....



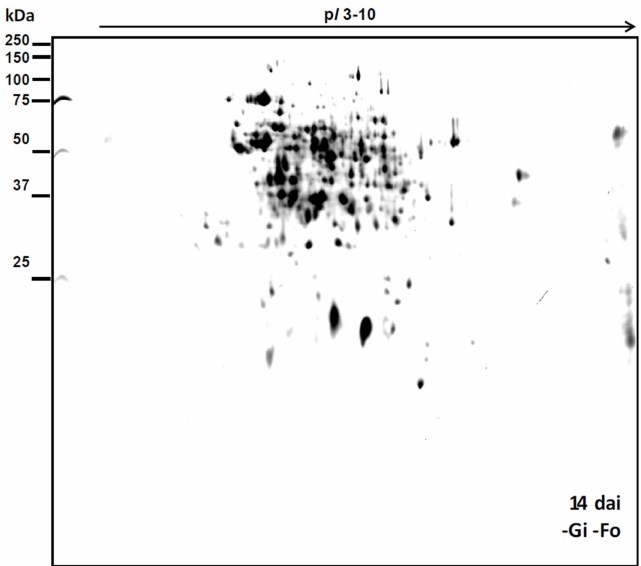
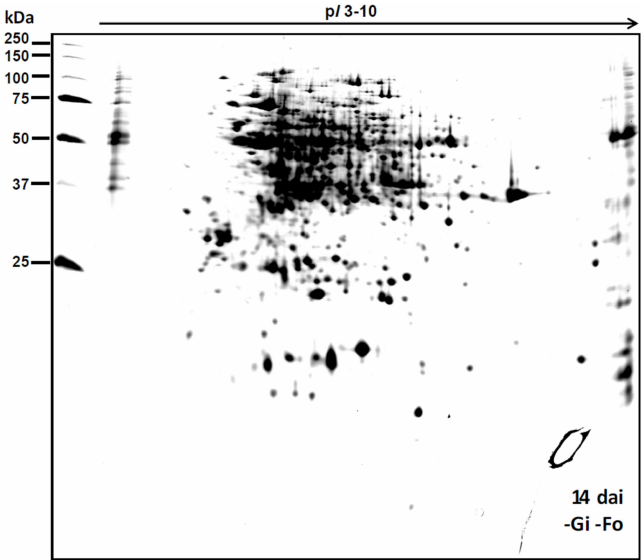
continua....



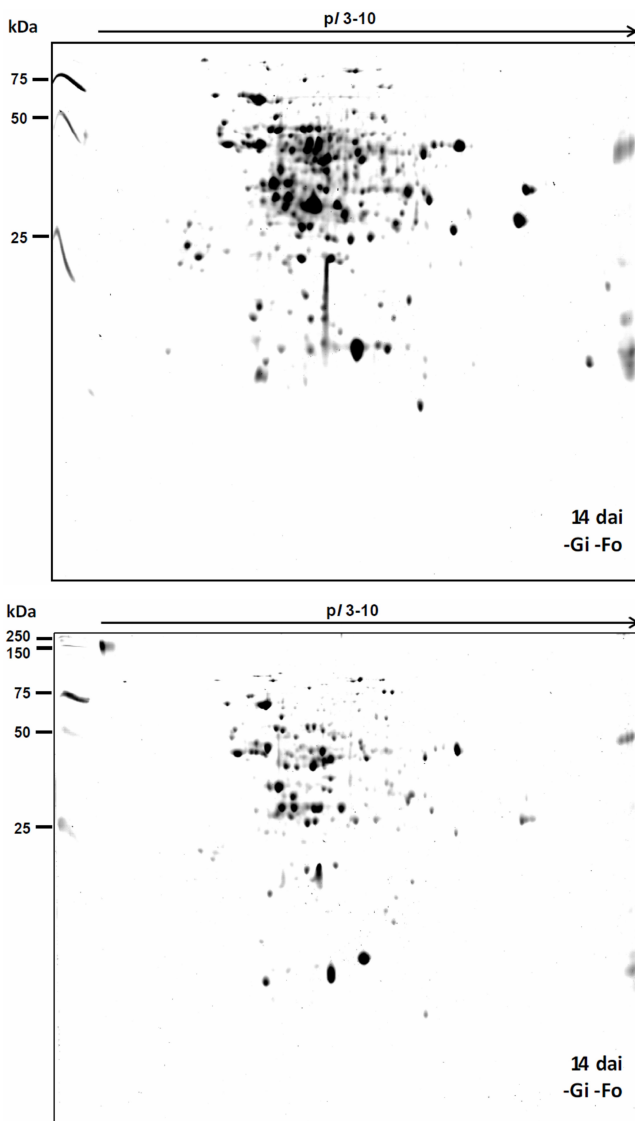
Anexo C. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 micorrizadas com *Glomus intraradices* (-Gi) e amostradas no momento da inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (0 dai).



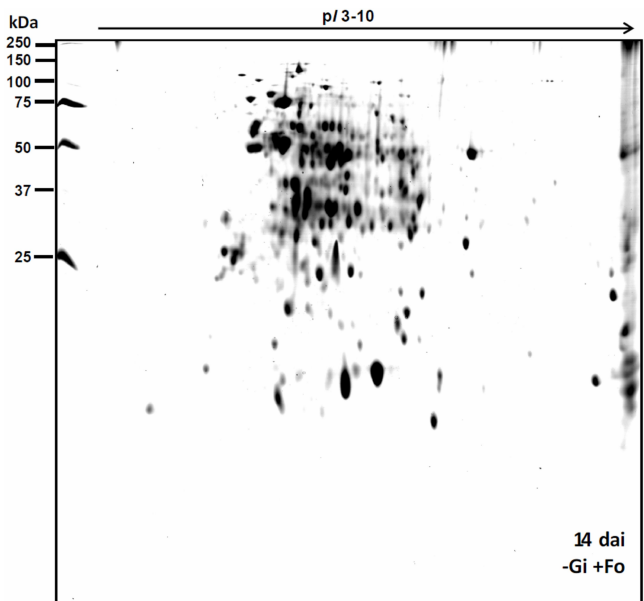
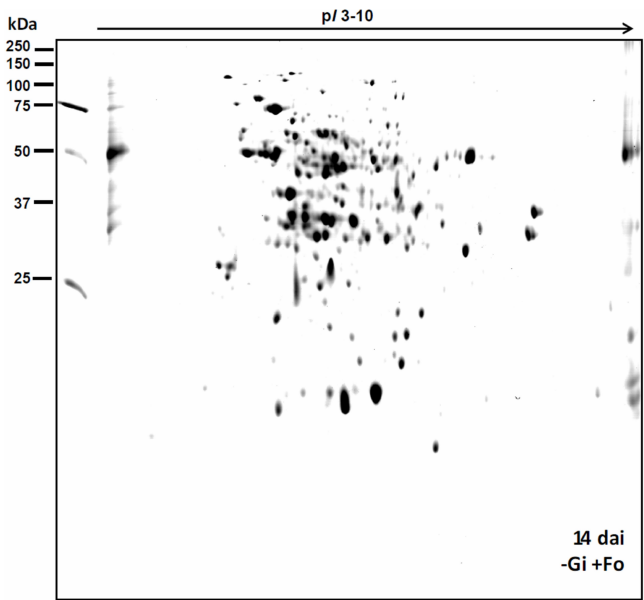
continua....



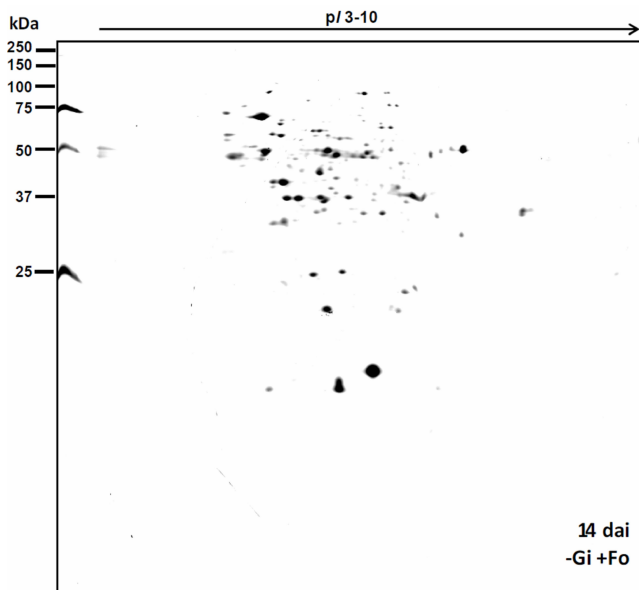
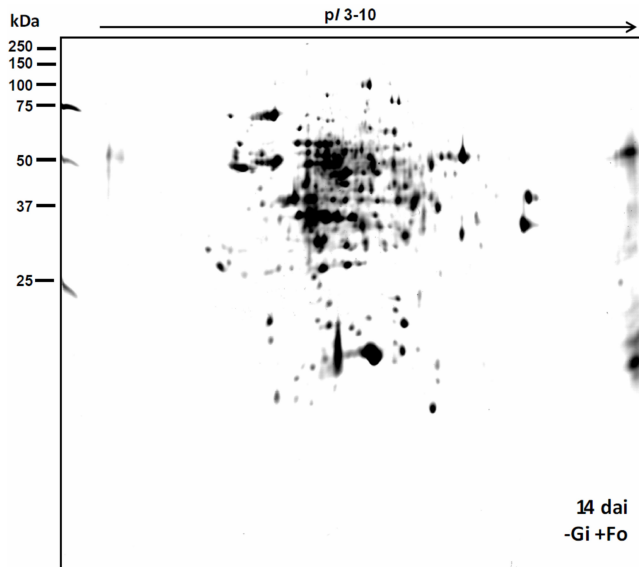
continua....



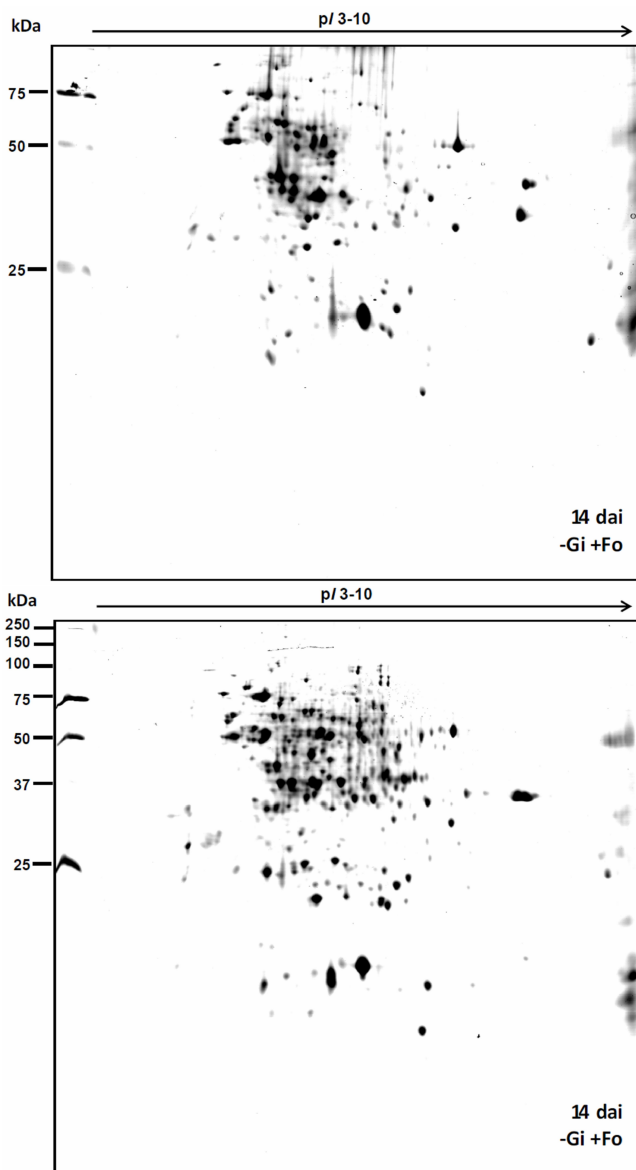
Anexo D. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 não inoculadas com *Glomus intraradices* (-Gi) e com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (-Fo). Amostras foram coletadas 14 dias após imersão do sistema radicular em água estéril (14 dai).



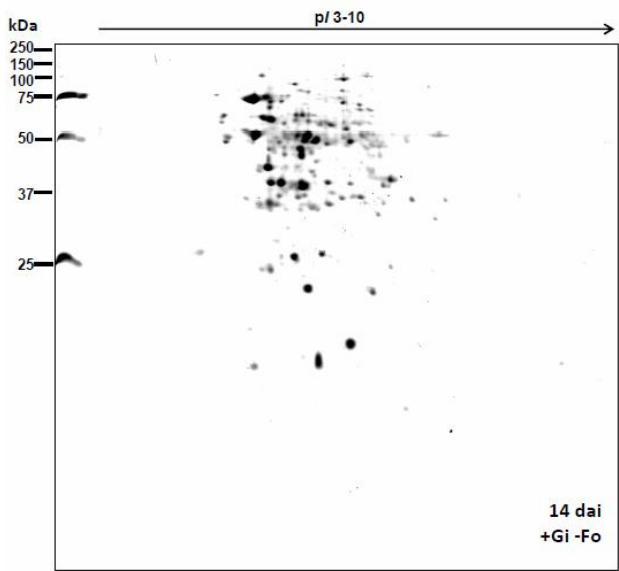
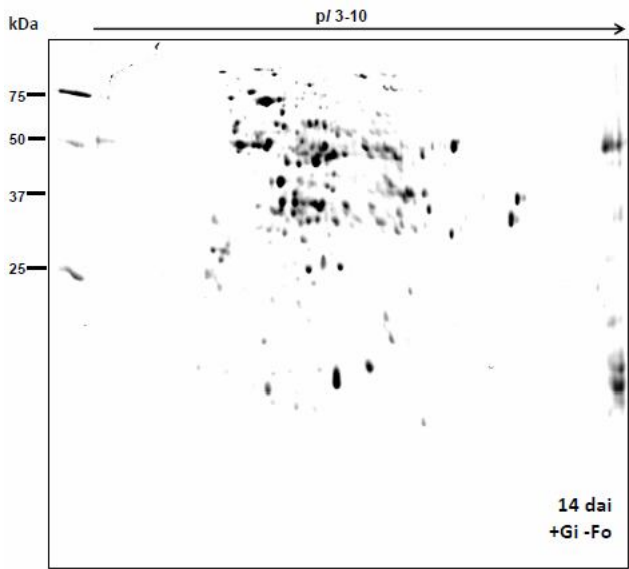
continua....



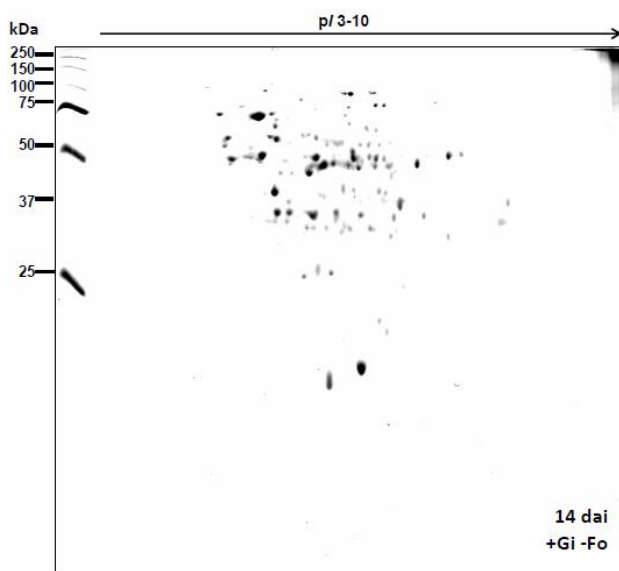
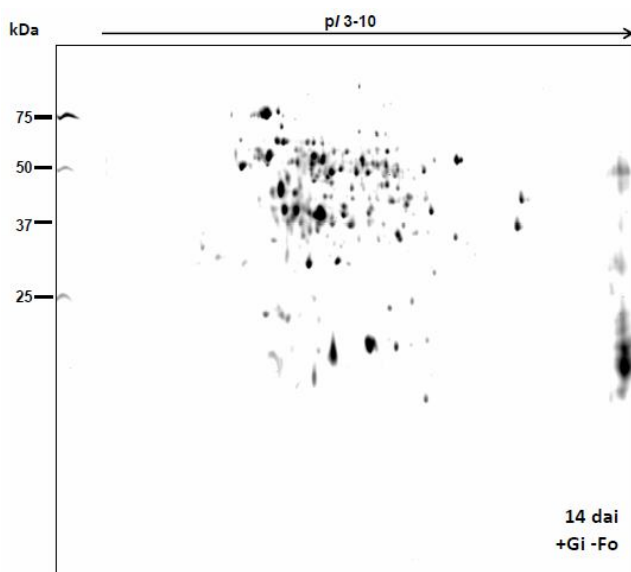
continua....



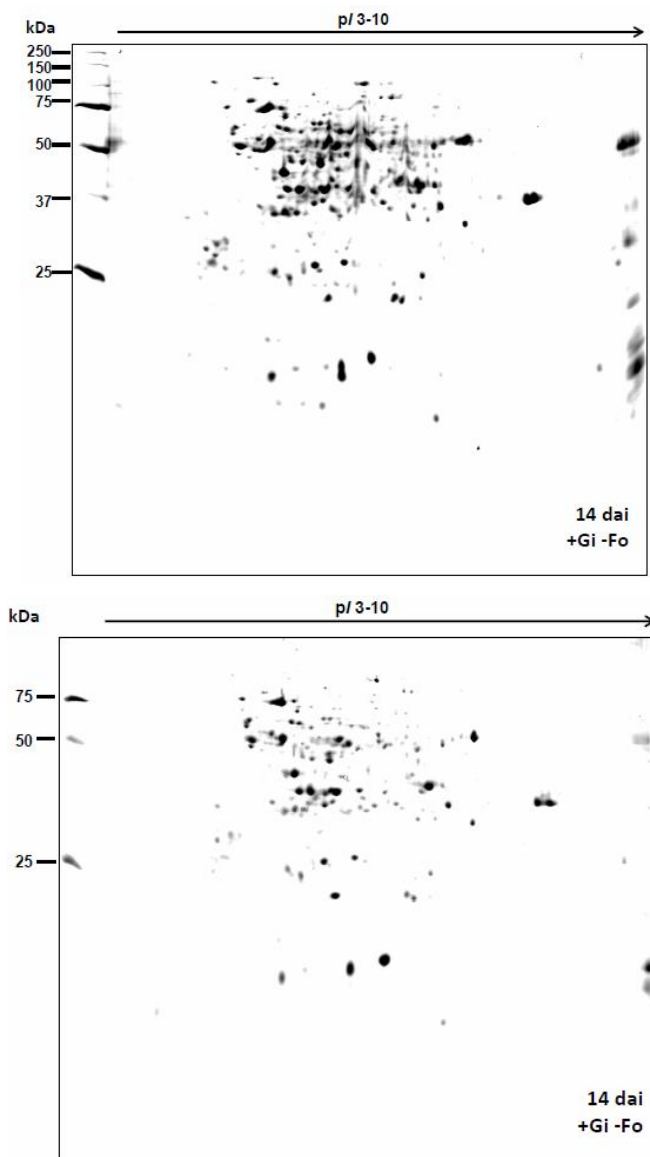
Anexo E. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 não micorrizadas com *Glomus intraradices* (-Gi) e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (+Fo). Amostras foram coletadas 14 dias após imersão do sistema radicular em suspensão de conídios do patógeno (14 dai).



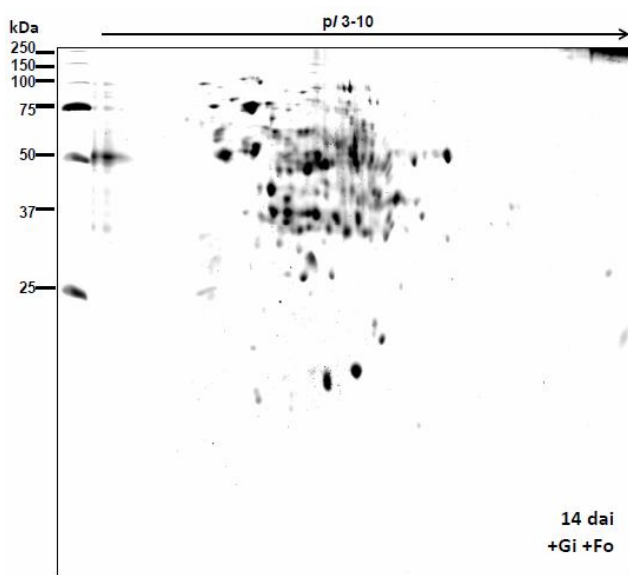
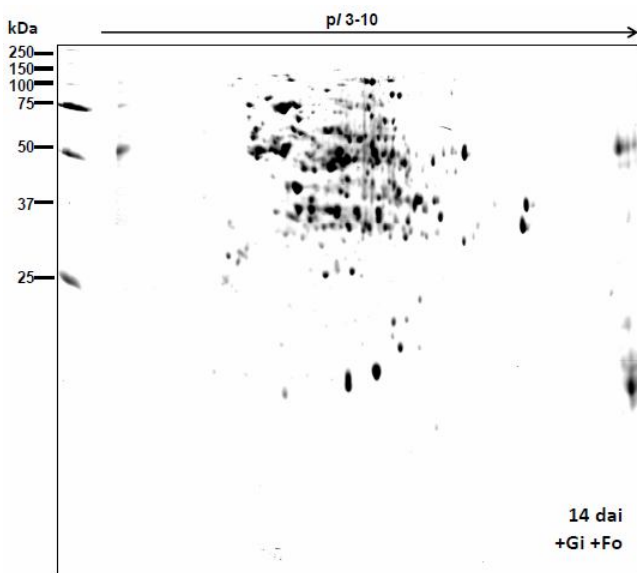
continua....



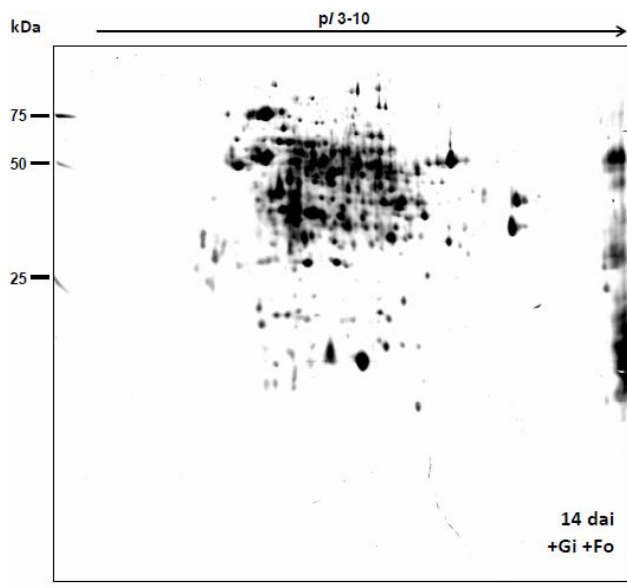
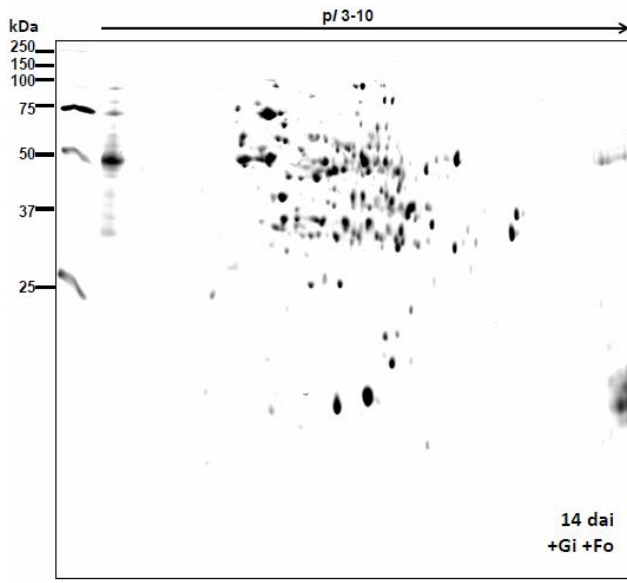
continua....



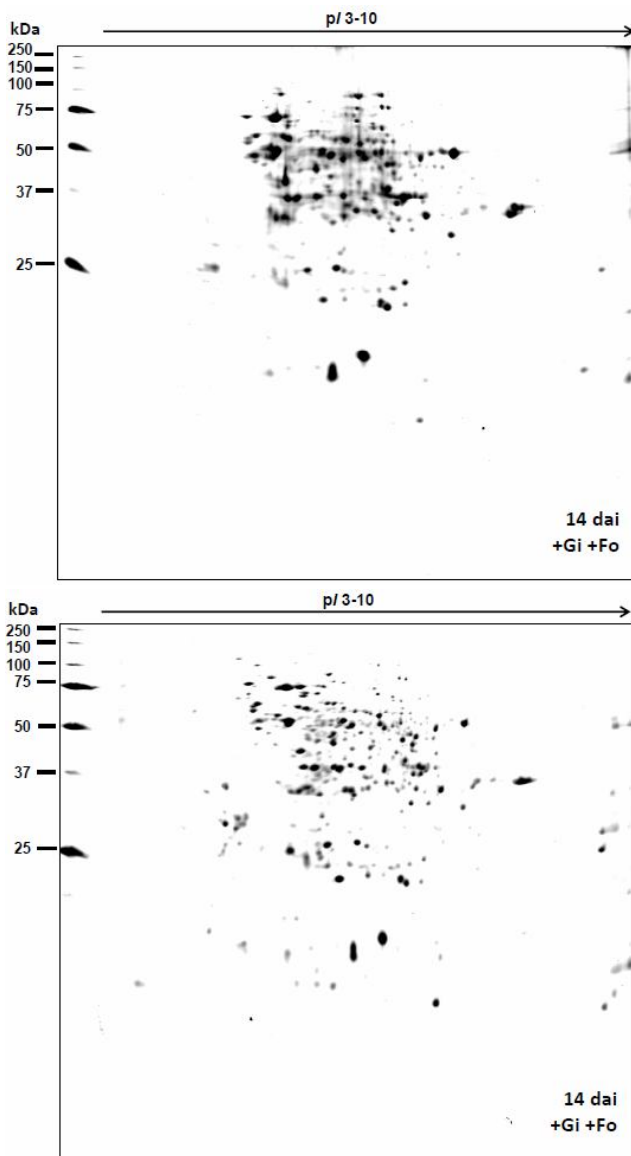
Anexo F. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 micorrizadas com *Glomus intraradices* (+Gi) e não inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (-Fo). Amostras foram coletadas 14 dias após imersão do sistema radicular em água estéril (14 dai).



continua....



continua....



Anexo G. Repetições dos perfis protéicos de eletroforese bidimensional de extratos radiculares de mudas do porta-enxerto de videira SO4 micorrizadas com *Glomus intraradices* (+Gi) e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (+Fo). Amostras foram coletadas 14 dias após imersão do sistema radicular em suspensão de conídios do patógeno (14 dai).